ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

КЛАБУКОВ ИЛЬЯ ДМИТРИЕВИЧ

МНОГОСЛОЙНАЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНАЯ КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ И БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ЖЕЛЧНЫХ ПУТЕЙ

14.03.03 – Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук
Люндуп Алексей
Валерьевич

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ 2

ВВЕДЕНИЕ 6

ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ЖЕЛЧНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАТИВНЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 15

1.1 Современные проблемы восстановления поврежденных органов и тканей с помощью нативных и искусственных материалов 15

1.2. Особенности реконструкции и восстановления поврежденного желчного протока 18

1.3. Обеспечение механической проходимости желчных путей при помощи имплантатов 24

1.4. Использование биологически совместимых имплантатов при восстановлении поврежденного желчного протока 31

1.5. Обеспечение физиологической совместимости имплантируемых конструкций. Тканеинженерный желчный проток 34

1.6. Проблемы восстановления желчного протока с использованием различных нативных и искусственных материалов 41

1.6.1. Проблема выбора материала для изготовления имплантатов желчных путей 42

1.6.2. Проблема эпителизации нативных и искусственных трансплантатов 47

1.6.3. Проблема васкуляризации имплантированного материала 50

1.6.4. Проблемы тканевой инженерии функционализированных имплантатов для замещения поврежденных желчных путей 54

1.7. Проектирование ТИК для замещения поврежденных тканей и органов 63

Заключение по Главе 1 66

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 67

2.1. Общая характеристика экспериментальных материалов и методов исследования 67

2.2. Полимерные материалы, использованные для изготовления синтетических каркасов 67

2.3. Биологически активные соединения, использованные для модификации и визуализации структур волокнистых материалов 68

2.3.1. Зеленый флуоресцентный белок 68

2.3.2. Эпидермальный фактор роста 69

2.3.3. Генотерапевтический препарат “Неоваскулген” 69

2.4. Метод электроформования для изготовления полимерных материалов каркаса 70
2.4.1. Метод электроформования нетканого материала каркаса 70
2.4.2. Эмульсионное электроформование модифицированных полимерных материалов 71
2.4.3. Изготовление трубчатых каркасов методом электроформования 72
2.4.4. Изготовление непроницаемых для желчи трубчатых каркасов с использованием полимерной пленки 72
2.4.5. Получение трехслойных композитных каркасов тканеинженерной конструкции 73
2.5. Физико-механические методы оценки свойств нативных и искусственных материалов 75
2.5.1. Определение физических характеристик волокнистых каркасов 75
2.5.2. Определение механических характеристик нативных тканей и синтетических каркасов 76
2.5.3. Изучение проницаемости материалов для водных растворов 78
2.5.4. Изучение непроницаемости пленок в составе композитных каркасов 79
2.5.5. Исследование биодеградации материалов каркаса в различных средах 79
2.5.6. Исследование хирургической прошиваемости волокнистого материала каркасов 80
2.6. Получение и культивирование клеток, высеваемых на волокнистые каркасы 81
2.6.1. Получение и культивирование ММСК КМ 81
2.6.2. Получение и культивирование ЭКЖП 83
2.6.3. Культивирование клеток линии NIH/3T3 84
2.6.4. Культивирование клеток линии MCF-7 84
2.7. Заселение волокнистых каркасов ЭКЖП и ММСК КМ 85
2.7.1. Заселение внутренней поверхности каркасов эпителиальными клетками методом тканевого культивирования 85
2.7.2. Заселение внешней поверхности каркасов мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга 87
2.8. Морфологические и аналитические методы исследования 88
2.8.1. Световая микроскопия 88
2.8.2. Конфокальная микроскопия 88
2.8.3. Флуоресцентная микроскопия 88
2.8.4. Сканирующая электронная микроскопия 89
2.8.5. Гистологические и гистохимические методы исследования 89

2.8.6. Иммуноферментный анализ выхода EGF 90
2.8.7. Скрининг материалов на клеточных линиях MCF-7 и NIH/3T3 с применением МТТ-теста 90
2.8.8. Цитометрия в реальном времени с подсчетом клеточного индекса 92
2.9. Лабораторные животные 94
2.9.1. Мелкие лабораторные животные (крысы) 94
2.9.2. Крупное лабораторное животное (свинья) 96
2.10. Методы статистической обработки 97
Заключение по Главе 2 97
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 99
3.1. Проектирование тканеинженерной конструкции желчного протока 99
3.1.1. Функциональный подход к проектированию ТИК желчного протока 99
3.1.2. Систематизация данных об анатомии, нормальной и патологической физиологии поврежденных желчных путей 100
3.1.3. Разработка функциональных требований к ТИК желчного протока 102
3.1.4. Выбор параметров васкуляризации ТИК желчного протока 104
3.1.5. Рациональный дизайн ТИК желчного протока 106
3.2. Выбор и оценка биосовместимости материалов для изготовления каркаса ТИК желчного протока 110
3.2.1. Создание волокнистых каркасов методом электроформования 111
3.2.2. Скрининговое исследование биосовместимости волокнистых образцов с использованием клеточных линий NIH/3T3 и MCF-7 111
3.2.3. Цитосовместимость волокнистых каркасов для ММСК КМ и ЭКЖП человека 115
3.2.4. Биологическая совместимость волокнистого поликапролактона для тканей мелких лабораторных животных 118
3.2.5. Тканеспецифичная совместимость каркаса из волокнистого поликапролактона на модели повреждения желчного протока свиньи 120
3.3. Физико-механические свойства нативных тканей и конструкций из волокнистых материалов 126
3.3.1. Механические свойства нативного желчного протока 126
3.3.2. Резорбция и механические свойства образцов одно- и многослойных волокнистых каркасов 127
3.3.3. Физико-механические свойства экспериментальных образцов тканеинженерной конструкции 132
3.4. Исследование материалов, модифицированных биологически активными соединениями 133

3.4.1. Модификация материалов биологически активными соединениями методом эмульсионного электроформования 133
3.4.2. Физико-механические свойства образцов волокнистых материалов, модифицированных биологически активными соединениями 135
3.4.3. Измерение выхода фактора роста EGF из волокнистого материала *in vitro* 137
3.4.4. Влияние волокнистого материала, модифицированного EGF, на пролиферацию клеток MCF-7 138
3.5. Резорбция образцов трубчатого каркаса в различных средах 140
3.6. Изучение активности прорастания сосудов в волокнистый поликапролактон, модифицированный препаратом “Неоваскулген”, при имплантации крысам в хроническом эксперименте 142
3.7. Оценка эффективности витализации многослойного каркаса ТИК клеточными культурами 148
3.7.1. Эпителиальные клетки желчного протока 148
3.7.2. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга 149
3.7.3. Двухслойное заселение волокнистых каркасов ТИК клеточными культурами 150
Заключение по Главе 3 153
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 154
4.1. Достаточность использованных в работе материалов и методов для решения поставленных задач 154
4.2. Систематизация результатов реконструктивных и восстановительных операций на желчных путях 157
4.3. Свойства материалов каркаса ТИК желчного протока 158
4.4. Клеточная, тканевая и физиологическая совместимость волокнистых материалов 162
4.5. Ангиогенная модификация материала каркаса биологически активным соединением 164
4.6. Двухэтапная витализация биосовместимого многослойного волокнистого каркаса клеточными культурами 168
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 173
ВЫВОДЫ 174
БЛАГОДАРНОСТИ 176
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 177
ЛИТЕРАТУРА 179

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Обеспечение физиологической и биологической совместимости трансплантатов, используемых для замещения поврежденных органов или тканей, является основополагающим принципом применения биоинженерных методов в медицине. Реконструктивная и восстановительная хирургия желчных путей является одной из практических областей медицины, где восстановление и длительное сохранение физиологических функций имплантатов может быть достигнуто посредством использования достижений современной тканевой инженерии.

Ежегодно в мире более 15 тыс. пациентов нуждаются в восстановлении нормального желчеоттока вследствие интраоперационных травм [230, 345]. Для решения данной проблемы на сегодняшний день разработаны и широко применяются многочисленные методики реконструктивных операций по восстановлению дренажной функции желчного протока, основанные на проведении пластики аутологичными тканями [40, 127] и применении билиарных стентов [23, 169]. Однако отмечается, что такой тип реконструктивных и восстановительных операций на желчных протоках сопровождается развитием ранних и поздних послеоперационных осложнений, нивелирующих их положительный эффект [14, 123, 261, 309], что позволяет констатировать отсутствие адекватного решения проблемы восстановления дренажной функции желчного протока.

Одним из перспективных направлений восстановления дренажной функции желчного протока является реконструкция поврежденных желчных протоков с применением методов тканевой инженерии. В рамках применения известных методов тканевой инженерии реконструкция желчного протока может осуществляться посредством использования соответствующих типов клеток,

полученных *in vitro* и размещенных на матриксах природного либо синтетического происхождения [80, 208].

Между тем, исходя из клинического опыта, применение биоинженерных тканей, созданных с использованием клеток и синтетического каркаса, приводит к развитию послеоперационных осложнений, таких как ишемическое повреждение клеток, очаговые и системные инфекции, формирование фиброза [171], которые сводят на нет успешно проведенную операцию.

Для снижения опасности развития послеоперационных осложнений должна быть использована технология изготовления каркаса, способного обеспечить надлежащую функцию. Для этого каркас должен быть не только биосовместимым и биодеградируемым, но и васкуляризированным, а также пригодным к длительному выполнению физиологических функций, не препятствуя свободному желчетоку. Данным требованиям соответствует тканеинженерная витализированная конструкция желчного протока, однако такой конструкции до сих пор создано не было.

В связи с вышеизложенным, витализация и обеспечение длительного функционирования тканеинженерных конструкций желчного протока является одной из актуальных задач, стоящей перед современной абдоминальной хирургией и гепатологией. Отсутствие на сегодняшний день тканеинженерных конструкций желчного протока, обладающих указанными свойствами, делающими их пригодными для имплантации, позволили нам сформулировать цели и задачи настоящего исследования.

Цель исследования: создать многослойную тканеинженерную конструкцию желчного протока, состоящую из клеток, адгезированных на биосовместимом и биодеградируемом каркасе, длительная дренажная функция которого обеспечивается его предварительной витализацией.

Задачи исследования:

1. Создать несколько типов биодеградируемых и биосовместимых волокнистых материалов и изучить их свойства, а также отобрать наиболее перспективные материалы, способные обеспечить восстановление и длительное сохранение дренажной функции желчного протока за счет применения методов их модификации.

2. Разработать дизайн тканеинженерной конструкции желчного протока на основе изготовленного методом электроформования трубчатого многослойного каркаса, обеспечивающего восстановление желчеоттока и длительный дренаж желчи.

3. Оценить физико-механические и биологические свойства изготовленных биосовместимых и биодеградируемых волокнистых каркасов тканеинженерной конструкции.

4. Изучить сохранность дренажной функции имплантированного биосовместимого и биодеградируемого трубчатого каркаса тканеинженерной конструкции желчного протока на модели повреждения общего желчного протока у крупного лабораторного животного (свинья).

5. Разработать методику модификации каркаса с использованием эпидермального фактора роста и плазмиды с геном фактора роста эндотелия сосудов (препарат «Неоваскулген»), а также оценить биологический и физиологический эффект использования таких каркасов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

6. Создать тканеинженерную конструкцию желчного протока, витализированную биологически активными соединениями и клеточными культурами.

Научная новизна

Проведена оценка физико-механических и биологических свойств биодеградируемых и биосовместимых волокнистых материалов (поликапролактон, поли(L,D-лактид-со-гликолид), поли(лактид-со-ε-капролактон) и диацтат

целлюлозы). Было установлено, что наиболее пригодными материалами для изготовления каркасов по своим биологическим и физико-механическим свойствам являются поликапролактон и поли(L,D-лактид-со-гликолид).

На основе трубчатого многослойного каркаса из отобранных биодеградируемых и биосовместимых волокнистых материалов разработана усовершенствованная тканеинженерная конструкция желчного протока, созданная из материалов с инкорпорированными биологически активными соединениями и двухслойным клеточным покрытием, причем внутренний слой заселен эпителиальными клетками желчного протока, а наружный – мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга.

Методом эмульсионного электроформования создан многослойный каркас с механическими свойствами, соответствующими свойствам нативного матрикса желчного протока.

Для длительного обеспечения дренажной функции желчного протока впервые использован способ витализации каркаса тканеинженерной конструкции модификацией биосовместимого и биодеградируемого волокнистого поликапролактона с включением в структуру волокон эмульсии с плазмидой, содержащей ген фактора роста эндотелия сосудов (VEGF165), и эмульсии с эпидермальным фактором роста (EGF). Методом биосенсорного анализа в режиме реального времени на клеточном анализаторе iCELLigence доказана эффективность модификации волокнистого поликапролактона с использованием EGF с целью стимулирования пролиферации клеток. При имплантации волокнистого поликапролактона, модифицированного препаратом «Неоваскулген», отмечена стимуляция васкулогенеза по мере биорезорбции материала. Применение трубчатого каркаса из поликапролактона на крупном лабораторном животном (свинья) при моделировании интраоперационной травмы желчного протока не показало обтурации просвета солями желчных кислот и выраженного воспаления тканей.

Получены патенты на изобретения «Способ изготовления трехслойного каркаса для протезирования желчного протока» (RU 2630061) и «Способ

получения тканеинженерной конструкции» (RU 2661738), а также на полезную модель «Каркас для протезирования желчного протока» (RU 163630).

Практическая значимость

Впервые разработан и обоснован дизайн тканеинженерной конструкции желчного протока, который предназначен для предотвращения возникновения не только ранних, но и поздних послеоперационных осложнений при восстановительных операциях на желчных путях. Предложенные в работе подходы к выбору и созданию материалов с биологически активными свойствами для получения многослойного каркаса тканеинженерной конструкции могут быть использованы при разработке различных имплантируемых медицинских изделий.

Метод эмульсионного электроформования может быть использован для изготовления многослойных каркасов с физико-механическими свойствами, соответствующими свойствам нативных тканей. Разработана методика витализации каркаса тканеинженерной конструкции плазмидой и эпидермальным фактором роста, обеспечивающая пролонгированный и контролируемый выход веществ по мере деградации материала каркаса для поддержания жизнедеятельности адгезированных клеток. Разработанные методы получения витализированных материалов и каркасов могут быть использованы для создания тканеинженерных конструкций полых эпителиальных органов.

Настоящая работа выполнена в рамках проекта «Создание тканеинженерной конструкции на основе биоразлагаемых и биосовместимых материалов с заданными свойствами для воспроизведения многослойных естественных живых структур», реализуемого в Первом МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России по соглашению о субсидии №14.604.21.0133 Минобрнауки России (руководитель проекта – д.м.н., профессор Дюжева Т.Г., шифр проекта RFMEFI60414X0133).

Положения, выносимые на защиту

1. Систематизация требований для обеспечения биологической и физиологической совместимости тканеинженерной конструкции желчного

протока позволяет обосновать методы и подходы к изготовлению многослойного трубчатого каркаса тканеинженерной конструкции из поликапролактона и поли(L,D-лактид-со-гликолида).

2. Метод эмульсионного электроформования пригоден для создания многослойного каркаса тканеинженерной конструкции с механическими свойствами, соответствующими свойствам нативного желчного протока.

3. Созданные методом электроформования трубчатые многослойные каркасы с различным сроком деградации полимеров по своим механическим свойствам соответствуют нативному желчному протоку и обеспечивают возможность многослойного заселения каркаса тканеинженерной конструкции *ex vivo* путем сначала тканевого культивирования эпителиальных клеток желчного протока, а затем динамического культивирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга с жизнеспособностью в конструкции более 85%.

4. Модификация материала каркаса тканеинженерной конструкции фактором роста EGF способствует пролонгированному выходу биомолекул *in vitro* по мере деградации материала и стимулирует пролиферацию клеточной культуры эпителиального происхождения.

5. Витализация материала каркаса тканеинженерной конструкции плазмидой с геном фактора роста эндотелия сосудов (препарат «Неоваскулген») способствует пролонгированному росту сосудов в зоне имплантации *in vivo*.

Апробация результатов исследования

Апробация диссертации состоялась 12 апреля 2018 г. на совместном заседании Отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины и Кафедры госпитальной хирургии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Материалы и основные положения работы доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях по специальности «Патологическая физиология», в том числе Международной научной конференции

«Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (г.Санкт-Петербург, 10–12 ноября 2015 г.), конференции «Современные подходы к лечению механической желтухи» (г.Москва, 19 ноября 2015 г.), II Национальном конгрессе по регенеративной медицине (г.Москва, 3–5 декабря 2015 г.), XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г.Москва, 17 марта 2016 г.), I-м Национальном хирургическом конгрессе (г.Москва, 4–7 апреля 2017 г.), XXIII конгрессе Ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ (г.Минск, 14-16 сентября 2016 г.), IX научных чтениях, посвященных 100-летию со дня рождения академика РАМН Е.Н. Мешалкина (г.Новосибирск, 16–18 июня 2016 г.), Международном симпозиуме “Нанотехнологии в хирургии: сегодняшний день и перспективы развития” (г. Москва, 16 мая 2017 г.), Международной конференции Sechenov International Biomedical Summit 2017 (г.Москва, 16–20 июня 2017 г.), Международной конференции «Клиническая протеомика. Постгеномная медицина 2017» (г.Москва, 30 октября – 1 ноября 2017 г.), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (г.Москва, 15–18 ноября 2017 г.), Международной конференции и выставке TERMIS-AM 2017 (г.Шарлотт, США, 3–6 декабря 2017 г.).

Достоверность научных положений и выводов

Представленные в работе результаты основаны на данных, полученных с использованием современных методов молекулярной и клеточной биологии, в том числе флуоресцентной микроскопии, иммуноферментного анализа, оценки жизнеспособности клеточных культур, с использованием статистических методов оценки достоверности результатов.

Личный вклад автора

Автором внесен определяющий вклад во все этапы диссертационного исследования, в том числе в проведение анализа литературных данных по теме

диссертации, разработку дизайна настоящего исследования, проведение экспериментальных работ, анализ и интерпретацию полученных данных. Часть исследований выполнена совместно с научным коллективом Отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Изготовление материалов конструкций и исследование физико-химических и механических свойств материалов проводились совместно с лабораторией полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт» (д.ф.-м.н. С.Н. Чвалун, к.х.н. Т.Х. Тенчурин, к.х.н. А.Д. Шепелев).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре госпитальной хирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и в практическую деятельность Отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология». Результаты проведенного исследования соответствуют специальности, конкретно п.8 (“Анализ взаимоотношений общего и частного, части и целого, единства и борьбы противоположностей в динамике развития патологического процесса”) и п.10 (“Разработка новых путей этиологической, патогенетической и саногенетической терапии с учетом взаимодействия терапевтических факторов с защитно-приспособительными механизмами организма”) паспорта специальности «Патологическая физиология».

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 6 работ в изданиях, индексируемых Scopus и рекомендованных ВАК для опубликования материалов диссертаций на соискание ученой степени.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 205 страницы, включает 67 рисунков, 13 таблиц и список литературы из 395 источников.

ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ ЖЕЛЧНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАТИВНЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Современные проблемы восстановления поврежденных органов и тканей с помощью нативных и искусственных материалов

Основной причиной смертей в настоящее время являются заболевания, приводящие к критическому разрушению или нарушению естественной структуры тканей с последующей потерей ими нормальных физиологических функций [191]. Вместе с тем полноценная реконструкция и рефункционализация поврежденных органов и тканей человека остается нерешенной задачей [320]. Причиной этого являются не только сложности, связанные с воспроизведением нормальной гистологической структуры тканей и фенотипическими различиями популяций клеток [80, 165], но также и индивидуальные особенности пациентов [393], оказывающие гетерогенный эффект на результаты выполняемых терапевтических и хирургических вмешательств.

В целях восстановления естественной анатомической структуры и нормальной физиологии тканей применяются хирургические методы с использованием искусственных материалов [376], аутологичных и аллогенных трансплантатов [288], клеточных технологий [366], а также биоинженерных графтов [82, 243]. Проведению таких операций, как правило, сопутствуют послеоперационные осложнения различной этиологии [136], выраженные в остром и хроническом воспалении, ишемии, инфекции и дисфункционализации поврежденных тканей.

В литературе отмечается, что в настоящее время не существует способа создания физиологически совместимых тканеинженерных трансплантатов, использование которых исключило бы возникновение негативных исходов и свело

бы к минимуму риски развития послеоперационных осложнений при выполнении реконструктивных и восстановительных операций [94].

Проблеме разработки методов воссоздания органов и тканей, которые бы позволяли избегать неблагоприятных исходов и осложнений, посвящено множество работ последнего десятилетия [163, 241, 251]. При этом сложность общих при создании биоинженерных органов проблем, связанных с васкуляризацией, обеспечением механической прочности и эффективности используемых клеток, зависела от выбора конкретного органа или ткани в качестве модельного объекта экспериментального исследования. Накопленные к настоящему моменту знания об использовании природных или искусственных материалов для восстановления объема и функционала поврежденных тканей носят, как правило, фрагментарный характер, а положительные результаты оцениваются в краткосрочной перспективе и не учитывают рисков поздних осложнений. Одной из причин, по которой использование одних и тех же материалов приводит к различным исходам, являются видовые, групповые и индивидуальные особенности репарационных процессов в организме, которые сопровождают хирургические вмешательства [393].

На сегодняшний день не существует какой-либо общепринятой биоинженерной классификации органов по общим для них морфологическим элементам или характеристикам [52]. Например, по классификации проф. Энтони Аталы нативные органы по сложности их создания можно разделить на четыре категории: 1) плоские органы (кожа); 2) трубчатые органы (сосуды, уретра, мочеточник); 3) полые органы (желудок и мочевой пузырь); 4) паренхиматозные органы (печень, почки, селезенка) [83].

Выбор модельного объекта для тканевой инженерии должен быть основан как на оценке практической значимости решаемой проблемы, так и на возможности решения поставленной задачи в соответствии с современным техническим уровнем. Вышеописанным критериям соответствуют такие модели органов, как кровеносный сосуд [55], мочевой пузырь [82], уретра [299], а также желчный проток [24].

Проблема создания биоинженерного желчного протока, который соответствует 2-й категории сложности по классификации проф. Э. Аталы, на сегодняшний день остается нерешенной и представляет высокий интерес в силу ряда причин, среди которых:

1. *Актуальность.* Патологии желчных путей, связанные с повреждением структуры желчного протока, представляют собой значимую для продолжительности и качества жизни проблему. Ежегодно в мире производится около 1 млн. операций по удалению желчного пузыря (холецистэктомии), при этом частота повреждения желчных протоков при открытой операции составляет 0,1-0,8%, при лапароскопической холецистэктомии колеблется от 0,3 до 3%, при резекции желудка – 0,14% [24]. Решению данной проблемы посвящено значительное число работ, однако удовлетворительного варианта решения до сих пор найдено не было.

2. *Перспективность объекта.* Патологическая физиология желчного протока имеет много общего с патологиями иных полых эпителиальных органов, вследствие чего решение данной проблемы частной патофизиологии билиарного тракта может привести к решению более общих проблем абдоминальной хирургии.

3. *Условная простота объекта.* Желчный проток – полый трубчатый орган со слабо развитой сосудистой сетью, гладкомышечной и нервной тканью, повторение которого проще реализации солидных органов со сложной организацией внутренних физиологических процессов.

Обособленный интерес к проблеме создания материалов для восстановительной хирургии желчных путей представляет также и историческое значение гепатобилиарных операций. Выдающийся немецкий хирург Hans Kehr так писал о своей специализации, отмечая всю сложность и исключительность данной области: "*Я оперировал все – и ампутации, и резекции суставов и многое другое, но потом сосредоточился на хирургии желчных путей*" [47]. По меткому выражению Б.А. Петрова и Э.И. Гальперина "*Реконструктивные операции на протоках составляют особую главу хирургии. Каждая такая операция – это творчество. Важна композиция, но и не меньше техника исполнения*" [46].

Достижения конца XX века по обеспечению качества и продолжительности жизни при трансплантации печени и лечении онкологических трансформаций органов гепатобилиарной зоны вновь вынесли проблему восстановления желчный путей на передний план высокотехнологичной медицинской помощи [65]. Подобные обстоятельства вдохновляли в творческом поиске не одно поколение исследователей, и настоящая работа не стала исключением.

1.2. Особенности реконструкции и восстановления поврежденного желчного протока

Реконструктивная и восстановительная хирургия желчного протока проделала нелегкий путь в XIX-XXI вв. в области патологических изменений и повреждений, и на сегодняшний день данная проблема пока еще далека от окончательного решения. В клинике проведена апробация дренирующих операций, выполнены восстановительные вмешательства на желчных протоках, применяется формирование разнообразных билиодигестивных соустий [13, 39]. В современных хирургических работах отмечается, что качественным прорывом в данной области стало предложение формировать билиодигестивное соустье на различного рода сменных каркасных дренажах [13, 26, 293], что заметно улучшило результаты лечения, но при этом оставило нерешенной проблему повторных вмешательств и высокой послеоперационной летальности (12% и более) [39]. На сегодняшний день подавляющим большинством хирургов “золотым стандартом” при необходимости восстановления желчеоттока считается восстановление пассажа желчи наложением билиодигестивного анастомоза с отключенной по Roux петлей тонкой кишки на погружном дренаже [19, 41].

Билиарный тракт представляет собой сложную систему желчеотведения, включающую внутрипеченочные желчные протоки, общий печеночный проток, образующийся от слияния правого и левого печеночных протоков, желчный пузырь со сфинктером Люткенса, общий желчный проток, начинающийся от места соединения общего печеночного и пузырного протоков и ампулы большого сосочка двенадцатиперстной кишки со сфинктером Одди [35, 214]. Общий

желчный проток представляет собой трубчатое образование около 7-9 см длиной, выстланное однослойным высоким цилиндрическим эпителием, поверхность которого практически не образует складок. Эпителиальные клетки желчного протока (ЭКЖП) в норме экспрессируют цитокератин-7 (CK-7) и цитокератин-19 (CK-19), а при онкологической трансформации – цитокератин-20 (CK-20) [180]. Основную массу общего желчного протока образует строма – слой плотной соединительной ткани, состоящей из коллаген-эластинового матрикса и небольшого количества сосудов. Периодически встречаются продольные гладкомышечные волокна, преимущественно в верхней части общего желчного протока и около сфинктера Одди [347].

На основании изложенного выше можно резюмировать анатомические и физиологические особенности нативного желчного протока, которые должны быть учтены при создании конструкции биоинженерного желчного протока.

1) *Анатомогистологические особенности*. Желчные протоки – это герметичные трубчатые образования со средним диаметром 3,5-5 мм, стенка которых представлена 3-мя основными слоями (слизистая, мышечная и серозная оболочки). Слизистая оболочка состоит из однослойного цилиндрического эпителия и собственной соединительнотканной пластинки, которая содержит много эластичных волокон, а также небольшое количество слизистых желез. Тонкая мышечная оболочка занимает среднюю позицию, состоит из пучков гладкомышечных клеток, между которыми много соединительной ткани. Наружный слой – адвентициальная оболочка, состоит из рыхлой соединительной ткани [32].

2) *Функциональные особенности желчных протоков*. Основной функцией желчных протоков является обеспечение пассажа стерильной, но токсичной для клеток желчи из печени и желчного пузыря в кишечник. Эластичность желчных протоков способствует равномерному продвижению желчи, а каркасные свойства стенки желчного протока позволяют сохранять просвет протока, препятствуя стазу желчи при продвижении ее из печени в двенадцатиперстную кишку.

3) *Особенности кровоснабжения*. Внепеченочные желчные протоки кровоснабжаются ветвями, исходящими из систем печеночной (верхняя часть протока) и поджелудочно-двенадцатиперстной (нижняя часть) артерий.

4) *Автономность желчных протоков от желудочно-кишечного тракта* обеспечивается сфинктером Одди, располагающимся в терминальном отделе общего желчного протока и препятствующим поступлению кишечного содержимого из двенадцатиперстной кишки.

5) *Агрессивная внутренняя среда*. Внутренняя среда желчного протока представлена желчью – изотонической жидкостью, выделяемой печенью ежедневно в объеме 500-600 мл, по своему электролитному составу похожей на плазму крови и способствующей ускоренному ферментативному разложению материалов.

Травма общего желчного протока представляет собой сложное и серьезное послеоперационное осложнение, которое, как правило, является следствием лапароскопической холецистэктомии [255]. Еще недавно появление данного осложнения являлось смертельно опасным для пациента. Так, французским врачом и историком медицины Виктором Фальконет-Дюфреном еще в 1860 году, за 15 лет до появления холецистэктомии, отмечалась[1] фатальность для пациента повреждения желчных путей [158].

Сегодня частота интраоперационных повреждений общего желчного протока составляет, по данным разных авторов, от 0,09 до 3,0% всех операций на органах брюшной полости [45]. Например, в большом ретроспективном обзоре успешности 10,123 лапароскопических холецистэктомий, выполненных в США в период с 1991 по 2013 год, было зафиксировано 19 пациентов с травмой желчного протока, что составляет 0,2% [284]. Эти данные интересно сравнить с клинической практикой конца XIX – начала XX века, когда обобщая опыт собственный и своего отца в Mayo Clinic (г. Рочестер, Миннесота), великий американский хирург William Mayo сообщал о 7-ми травмах общего желчного протока при 1100 открытых операциях на желчных путях [253], что соответствует частоте 0,6%. Общий вид открытого

---

[1] (фр.) *"...la blessure des voies biliaires soit, en général, mortelle."* (V.-A. Fauconneau-Dufresne, 1860)

абдоминального доступа при проведении холецистэктомии приведен на рисунке 1.1.

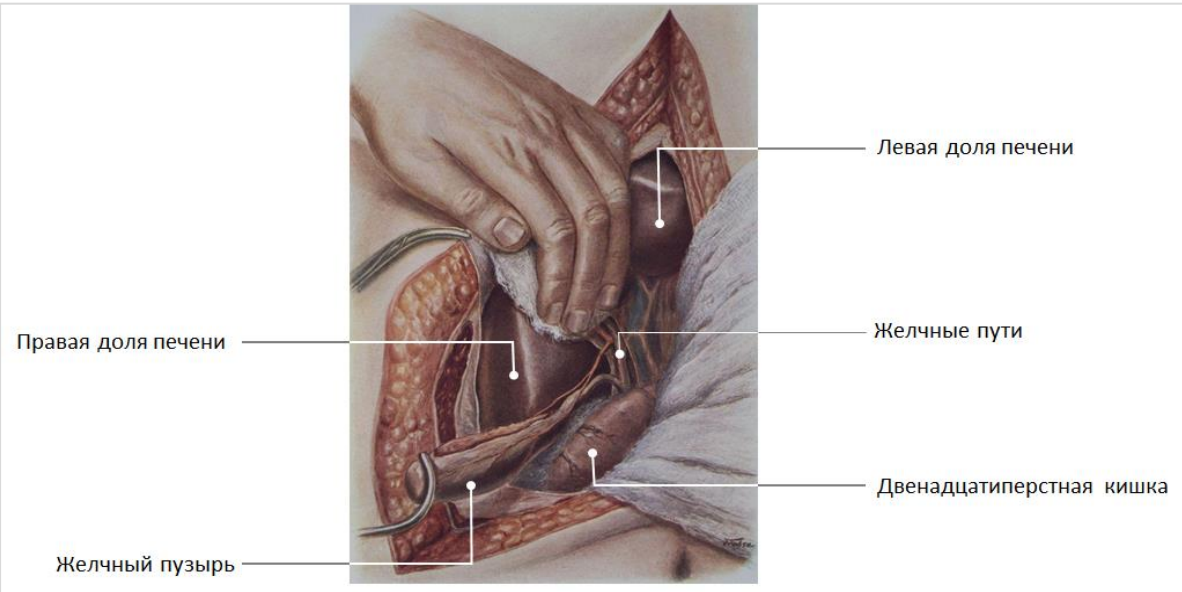


Рисунок 1.1 Вид открытого абдоминального доступа к гепатопанкреатобилиарной зоне. Адаптированный рисунок приводится по Kehr (1913)

Хотя сегодня хирургические методы позволили значительно снизить процент ошибок при операциях на гепатопанкреатобилиарной зоне, полностью избегать подобных ошибок пока не удалось. Выдающийся русский хирург С.П. Федоров характеризовал эту проблему следующим образом: “*Ни в одной области хирургии не приходится хирургу бывать в таком затруднительном положении, как при операциях на желчных путях, и нигде нельзя повредить так больному малейшей ошибкой, допущенной при операции”* [60]. По меткому замечанию известного хирурга Эмилио Италы “*Хирургические повреждения общего желчного протока часто становятся началом драмы. Неосторожное движение концами ножниц за одну секунду может привести к повреждению настолько серьезному, что с его последствиями придется бороться в течение всей жизни пациента”* [28]. Повреждение желчевыводящих протоков – тяжелейшее осложнение лапароскопической холецистэктомии, предопределяющее дальнейшее качество и продолжительность жизни пациентов, в большинстве своем людей

работоспособного возраста в возрасте 40-55 лет, причем повреждения желчных протоков увеличивают риск гибели больных в 3 раза [161].

Использование материалов из различных источников для восстановления нормального желчеоттока хирургическими методами проводится в случаях травмы или опухолевого процесса [328]. В большинстве случаев, особенно при ранениях протока, связанных с его полным пересечением или иссечением, основным методом лечения является проведение реконструктивной операции, которая вынужденно нарушает естественное отхождение желчи через большой сосочек двенадцатиперстной кишки в связи с необходимостью формирования соустья между поврежденным протоком и отключенной из пищеварения петлей тонкой кишки (наложение гепатикоеюноанастомоза). В такой ситуации отток желчи из печени происходит при исключенном из пассажа сфинктером Одди, нарушается автономность желчного древа, велика вероятность инфицирования и развития септических осложнений.

Варианты восстановительной операции на желчных путях включают пластическую операцию типа Гейнеке-Микулича, наложение билио-билиарного анастомоза, пластическое закрытие дефекта с использованием аутоткани, либо бужирование [63]. Успешность таких операций наблюдалась в случае нециркулярных дефектов протока при поражении рубцовым процессом сегмента не более чем на ⅔. Новые технологии стентирования открыли перспективу проведения восстановительных вмешательств с сохранением естественного пассажа желчи в двенадцатиперстную кишку при использовании эндоскопически устанавливаемых стентов различных конструкций. Однако, стентирование примерно в 15% случаев приводит к ранним осложнениям, связанным с миграцией эндопротеза, развитием панкреатита и воспалением слизистой оболочки желчного протока. Наиболее частым поздним осложнением является обструкция стента билиарным сладжем, обычно спустя 3-4,5 месяцев при использовании пластиковых стентов и 6-7 месяцев при использовании металлических, приводящая к необходимости частой замены протеза. Замена небиодеградируемых стентов

сопряжена со значительными трудностями, обусловленными прорастанием тканей протока в ячейки стента [216].

Обобщая исторический опыт восстановления нормального желчеоттока, исследователи, как правило, рассматривают технологии использования протезов из искусственных материалов, ауто- и аллотрансплантатов, а также изделий на основе биодеградируемых материалов [41, 343]. В настоящей работе мы рассмотрели исторический опыт использования различных материалов и методов для восстановления нормального желчеоттока на основе функционального подхода, представленного на рисунке 1.2.

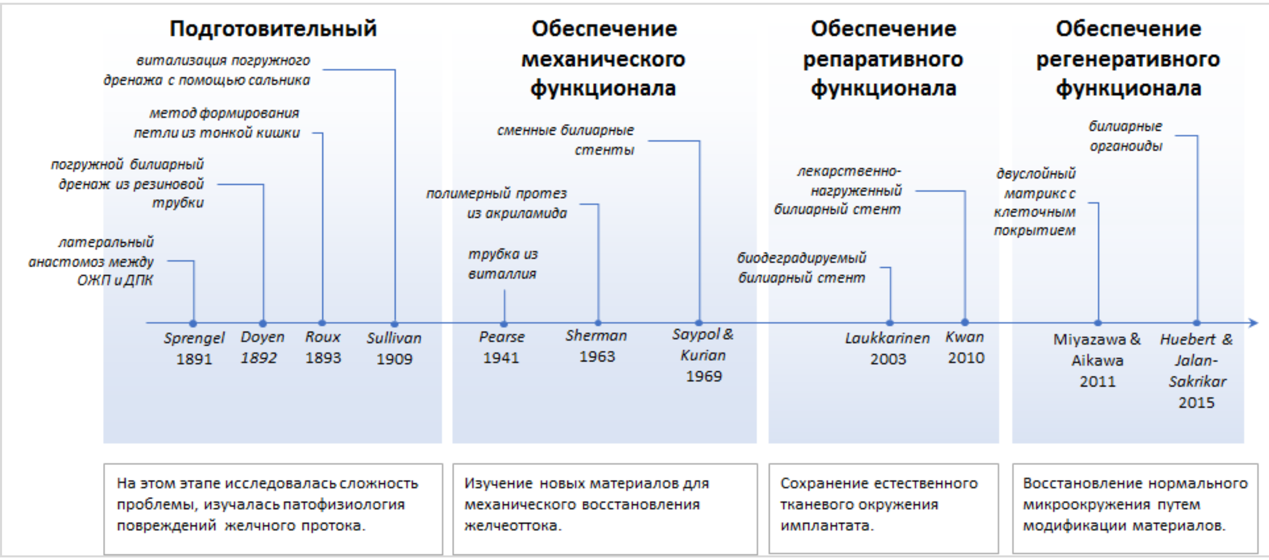


Рисунок 1.2 Эволюция достижений в области восстановления нормального желчеоттока

В течение конца XIX – начала XX века врачи-исследователи изучали нормальную и патологическую физиологию желчных путей, и получали первые результаты использования искусственных материалов в эксперименте и клинике. Эпохальными событиями данного этапа стали клинические работы Hans Kehr, William Mayo, John Deaver и С.П. Федорова, в которых были собраны и обобщены многочисленные клинические случаи, обосновывающие состоятельные методы билиарной хирургии, в том числе Т-образный дренаж и холедохоеюностомию по

Ру (наложение анастомоза “конец в бок” между культей общего желчного протока и отключенной петлей тощей кишки).

В ранних экспериментальных операциях для замещения циркулярных дефектов общего желчного протока использовались погружные стенты, яремные вены (Stropeni and Giacinto, 1914), лоскуты из стенки двенадцатиперстной кишки (Башкиров, 1909; Stropeni and Giordano, 1914), аппендикса (Molineus, 1913) или желудка (Kehr, 1913). Однако в работах уже того времени подчеркивалось, что все данные остроумные предложения не приводили к положительным результатам и имели лишь исторический интерес [60]. Выполнение реконструктивных операций на общем желчном протоке предпринималось в очень тяжелых, практически безнадежных случаях без всякой гарантии успеха, и даже сегодня отмечается, что неосложненное восстановление поврежденного желчного протока все еще остается нерешенной проблемой абдоминальной хирургии, для которой отсутствуют удовлетворительные методы решения [140, 234, 261].

1.3. Обеспечение механической проходимости желчных путей при помощи имплантатов

В начале XX века получил свое обоснование подход, основанный на продолжительном механическом поддержании желчеоттока с использованием доступных материалов или тканей. Такие реконструктивные хирургические операции не всегда позволяли добиться положительных поздних результатов, но в некоторых случаях приводили к эпителизации внутренней стенки трансплантата природного или синтетического происхождения. Относительно низкие значения внутрипротокового давления и невысокие механические напряжения в тканях стенки протока поддерживали мнение об относительной простоте обеспечения механической проходимости желчных путей.

Отсутствие достаточного опыта в области наложения сосудистых анастомозов до внедрения в клиническую практику работ Carrel (1907) делало практическое использование нативных тканей трудноосуществимым [122]. Поэтому развитие методов трансплантации живых тканей сопровождалось

изучением материалов для создания искусственных имплантатов. Первые найденные упоминания об использовании искусственных материалов для билиарного дренажа приведены в работе Sullivan (1909) по использованию резиновой трубки в эксперименте на собаках [352]. Также весьма характерен метод Wilms (1913) по использованию резиновых трубок в качестве погружных дренажей для соединения отрезков протока [378], который в начале XX века был апробирован более чем в сотне клинических операций [61].

При использовании погружных дренажей заживление и восстановление протока осуществляется за счет обрастания дренажа соединительной тканью и эпителизации получившегося канала от выстилающего проток эпителия (регенерация по каркасу) [60]. Период фиксации дренажа для предотвращения развития стеноза различными авторами оценивался в 5-6 недель (Wilms, 1913), 6-8 недель (Champeau and Pineau, 1952) [125], 3-5 месяцев (Б.А. Петров и Э.И. Гальперин, 1971) [46], 6-8 месяцев (Warren and McDonald, 1964) [374] или даже в 1 год (Lahey and Pyrtek, 1950) [225], что подчеркивало необходимость длительного пребывания дренажа для обеспечения успеха операции. При этом замещение дефекта протоков такими протезами оставалось ненадежным, эпителизация новообразованного протока после извлечения или отхождения дренажной трубки – “благим намерением”[2] [154, 159], а отхождение дренажа – началом образования стриктуры [206]. В дальнейшем стало очевидно, что резиновые трубки имеют ряд нежелательных свойств: они постепенно разрушаются, склонны к обструкции желчью [120] и могут выступать в качестве местнораздражающего фактора, стимулирующего фиброзную реакцию тканей. Кроме того, Brudenell (1954) отмечал, что резина поддерживает рост бактерий с последующим риском развития холангита [110].

В попытке избежать этих осложнений в клинике были опробованы поливинилхлорид (ПВХ) и силастик [77]. Трубки из силастика были впервые успешно применены на собаках Sanislow & Zuidema (1963) [315], но уже в клинике

[2] (нем.) *“Die allmaehliehe Epithelisierung des Ganges nach Abstoftung der Gummiprothese bleibt immer noch ein frommer Wunsch”.*

обнаружилась их высокая чувствительность к малейшим механическим повреждениям, сделавшая непригодным дальнейшее использование в качестве материала для билиарного дренажа [120]. Также использование трубок из силастика, как и ранее из резины, приводило к развитию воспаления в зоне имплантации.

Использование ПВХ также не показало удовлетворительных результатов вследствие механической несостоятельности. Если при использовании резиновых или латексных трубок билиарный перитонит являлся редким осложнением, то Winstone et al. (1965) при имплантации трубок из ПВХ сообщали о 4% случаев билиарного перитонита [379].

Использование трубчатых протезов из политетрафторэтилена (ПТФЭ или Тефлон) показало неоднозначные результаты в эксперименте и клинике. Thomas et al. (1964) сообщали об использовании тефлоновой заплаты при оперировании стриктуры общего желчного протока, при этом осложнений не отмечалось спустя 15 лет [266, 361]. Использование тефлоновой заплаты в клинике показало отсутствие явно выраженных нарушений желчеотведения в сроки наблюдения до 2-х лет [187]. В эксперименте Gomez et al. (2002) на собаках создавалась модель стриктуры общего желчного протока путем его перевязки с последующим замещением участка протока жестким трубчатым трансплантатом из тефлона с дистальным анастомозом с двенадцатиперстной кишкой [172]. На сроках экспозиции до 3-х месяцев показано, что трансплантаты были свободно проходимы и покрывались слоем тонкой соединительной ткани, при этом холестаза отмечено не было. Подобные результаты получены и при использовании сосудистых протезов из тефлоновой сетки ”Gore-Tex” [1], однако, короткие сроки наблюдения не позволили исследователям сделать вывод об эпителизации трансплантатов, не исключая тем самым образование стриктур и иных поздних осложнений.

Изучение эффективности применения комбинированных трансплантатов на основе обработанного коллагеном пористого материала было проведено в эксперименте на собаках Nakashima et al. (2007), в котором использовался покрытый коллагеном трубчатый протез из тефлоновой сетки для замещения

сегмента общего желчного протока [267]. Было показано, что на сроке 3 месяца внутренняя стенка трансплантата полностью эпителизировалась, и протез успешно выполнял функцию желчеоттока на протяжении 12-и месяцев.

В работах Kirchner et al. (1978, 1980) в эксперименте на собаках проводилось сравнение эффективности замещения сегмента внепеченочного желчного протока ксенотрансплантатом Solcograft (пупочная вена человека, обработанная глютаральдегидом) и протезом из пористого тефлона (размеры пор составляли 100 мкм), причем в случае пористого тефлона получили лучшие результаты: эпителизация тефлоновой вставки происходила у всех животных спустя 4 недели [219, 220].

Использование новой материальной и инструментальной базы ожидаемо приводило к улучшению результатов экспериментальных работ. Если в эксперименте Mendelowitz and Beal (1982) были получены неудовлетворительные результаты при замещении участка желчного протока тефлоновыми протезами у собак [256], то уже в работе Ren and Shi (2001) на модели собаки отмечалась эпителизация внутренней поверхности тефлонового протеза участка общего желчного протока у 40% животных в сроки до 52 недель, а при использовании заплаты – уже у 75% животных [300].

Deaver (1904) впервые использовал для дренирования общего желчного протока Т-образный дренаж, который обеспечивал как отведение желчи наружу, так и давал возможность прохождения ее по протоку в двенадцатиперстную кишку [138]. В клиническом опыте Propping (1913) по восстановлению дефекта желчного протока длиною 4 см выполнялась установка между отрезками протока Т-образного дренажа, который вынимался по восстановлении канала через 3 недели [297]. Данный опыт наружного дренирования показал свою значимость, и со временем в различных вариациях вошел в клиническую практику. При использовании Т-образных или иных наружных дренажей в течение 2-4 недель или более наблюдается декомпрессия желчных путей, снижается воспалительная реакция в тканях, происходит восстановление нормального кровоснабжения, и тем самым снижаются риски развития стеноза [233].

В начале XX века для замещения циркулярных дефектов общего желчного протока начал впервые использоваться стент («погружной дренаж»), при этом каналы образовывали из лоскутов, выкроенных из стенки двенадцатиперстной кишки или желудка [5, 59, 348]. Однако наилучшие результаты реконструктивного применения нативных тканей были получены при использовании венозных графтов. Еще в 1909 г. ассистентом Императорской медико-хирургической академии А.Ф. Башкировым было высказано предложение полностью замещать общий печеночно-желчный проток участком аутовены [5], и уже в экспериментальной работе Horsley (1918) впервые сообщалось об использовании венозного трансплантата для восстановления нормального желчеоттока у собак [193]. Однако дальнейшие исследования показали, что венозный трансплантат подвержен сморщиванию, не всегда полностью эпителизируется, и поэтому в клинике этот метод не нашел применения [63]. Так, Hartung et al. (1976) сообщали о неудовлетворительных результатах применения венозного трансплантата вследствие развития некроза, замещения стенки фиброзной тканью и сужения просвета, которые характеризовали отсутствие эпителизации внутренней поверхности трансплантата [187]. В других исследованиях при аутовенозной пластике были отмечены серьезные осложнения в виде некроза трансплантата, стеноза или развития холестаза [333].

В систематическом исследовании вопросов восстановительной и реконструктивной хирургии внепеченочных желчных протоков (Марков П.В., 2016) подчеркивалось, что способы аутовенозной пластики в основном разрабатывались в эксперименте на животных, а в клинической практике описаны лишь отдельные успешные наблюдения, а оценка эффективности использования иных ауто- и аллотрансплантатов показала неоднозначные результаты [41]. Среди артефактов подобных неудачных попыток можно отметить протезирование желчных протоков крыс лиофилизированной и силиконизированной твердой мозговой оболочкой [166].

Наряду с неудачами при восстановительных операциях при полном пересечении общего желчного протока, исследователями были получены хорошие

результаты при замещении нециркулярных дефектов. При сохранении полноценной задней стенки желчного протока шириной 2-3 мм эпителизация внутренней поверхности венозного трансплантата достигалась уже к 6 неделям [97]. Аналогичный результат в экспериментах на собаках получили В.Я. Золоторевский и соавт. (1986), которые замещали дефект общего желчного протока длиной 10-12 мм и шириной 2-2,5 мм без какого-либо дренирования и уже через месяц отмечали эпителизацию внутренней поверхности венозной заплаты ЭКЖП, а соединительная ткань капсулы содержала многочисленные кровеносные сосуды, главным образом капилляры и артерии малого диаметра [394] (цит. по Марков П.В., 2016). Отмечалось, что эпителизация трансплантата наблюдалась на модели собак при замещении протяженных дефектов общего печеночно-желчного протока длиной 2 см сегментом аутовены на каркасном дренаже [211].

Важность сохранения каркасной функции трансплантата была показана в многочисленных хирургических работах. Например, Cushieri et al. (1983) в эксперименте на свиньях проводили сравнительный анализ использования аутовенозного трансплантата как с использованием стента, поддерживающего трубчатую форму, так и без него. При отсутствии стента отмечался стеноз трансплантата, чего не наблюдалось в группе животных со стентом. Показано, что на 4-й месяц наблюдения в зоне трансплантата гистологические элементы вены были полностью замещены соединительной тканью, покрытой эпителием желчного протока [41, 134].

Аналогичные результаты получены в экспериментальных работах по замещению дефекта желчного протока длиной 2 см венозным аутотрансплантатом на свиньях в группах без стента и со стентом из полилактида (PLA) [188, 189, 279]. При этом в группе без стентирования был получен неудовлетворительный результат, а в группе со стентированием после экспозиции в течение 6-и месяцев все животные не имели признаков холестаза. Деградация стентов из PLA происходила уже к 4-м месяцам, при этом сами трансплантаты к 3-му месяцу экспозиции были выстланы эпителием желчных протоков [188]. В работах Heistermann (2006) и Palmes et al. (2009) показан поддерживающий характер

использования биодеградируемой конструкции, причем показанная в данных работах длина эпителизированного участка желчного протока (~2 см) является характерной дистанцией эпителизации имплантатов, которая встречается и в других экспериментальных и клинических работах. В работе Montalvo-Javé et al. (2015) в эксперименте на свиньях использовался протез из коллагена длиной 3 см, при этом ремоделирование субсерозной оболочки и эпителизация происходили на 6-й месяц [260]. Об одном случае успешного клинического использования сегмента аутовены на скрытом дренаже при дефекте протока длиной 3 см сообщили Ю.А. Давыдов и А.Б. Ларичев (1991), при этом срок наблюдения составил 8 лет [275] (цит. по Марков П.В., 2016).

В последние годы появились экспериментальные исследования, посвященные использованию заплат и вставок из синтетических биодеградируемых материалов [68, 357], которые показывают лучшие результаты по сравнению с замещением целых сегментов. Например, сообщается о хороших клинических результатах использования трансплантата из аутовены в виде заплаты с сохранением непрерывности одной из стенок желчного протока [308, 313]. Так, Ellis and Hoile (1980) приводят два успешных клинических наблюдения использования аутовенозной заплаты, первое из которых прослежено с хорошим отдаленным результатом на сроке 9-и лет [153]. Rosen et al. (2002) в эксперименте на собаках показали возможность использования подслизистой оболочки тонкого кишечника свиньи в качестве заплаты желчного протока. При этом уже через 2 недели наблюдались признаки инфильтрации нативными фибробластами, кровеносными сосудами и слизистой оболочкой желчных путей. В течение 3-х месяцев трансплантат был замещен нативным коллагеном, покрытым билиарным эпителием [302]. Однако использование оболочки тонкой кишки имеет свои недостатки, поскольку делает реципиента восприимчивым к зоонозной инфекции в случае использования тканей животного и может вызывать образование рубцовых стриктур.

В исследовании Tao et al. (2014) изучалась эффективность использования коллагеновой заплаты в выборке из 20 экспериментальных гибридных свиней,

разделенных на экспериментальную и контрольную группы. Веретенообразный дефект желчного протока размером 20 мм × 6 мм был восстановлен с использованием участка коллагеновой мембраны с каркасом в виде дренажной трубки (удалена через 12 недель), вокруг которой был обернут большой сальник. Спустя 12 недель структура новообразованных тканей была подобна нативной, что было показано при окраске гематоксилином-эозином, иммуногистохимическом окрашивании против CK7, а также при окрашивании по Ван Гизону [356]. Отмечалось, что коллаген отличается пористостью, биологической совместимостью, возможностью деградации в организме и способен поддержать свою форму в присутствии желчи в течение 4-х недель [24].

Формальным завершением этапа поиска удовлетворительного способа обеспечения механического функционала стали разработка и первый опыт клинического использования самораскрывающихся билиарных стентов в 1980-х годах [132], открывшие путь к созданию биологически совместимых конструкций.

1.4. Использование биологически совместимых имплантатов при восстановлении поврежденного желчного протока

Следующим важным этапом развития научной мысли при создании протезов желчных протоков (погружных дренажей) было решение проблемы совместимости тканей и материала трансплантата, что должно было снизить риски развития воспалительных процессов и инфекционных осложнений. С этой целью с различным успехом ранее использовались трубчатые конструкции из различных материалов, ауто- и аллоткани. В различных экспериментальных исследованиях по реконструктивной хирургии желчевыводящих путей проводилось изучение биологической совместимости билиарных протезов и заплаток из подслизистой тонкой кишки [302], участка подкожной вены [153], артерии [317], тонких кожных трансплантатов [76], уретры [322], фасции [170], влагалища прямой мышцы живота [87], стенки желчного пузыря [97], а также гомографта желчного протока [232]. Однако наилучшие результаты по биологической совместимости показали билиарные стенты.

Первые установки билиарных стентов были проведены в 1980 году и описаны в работах Soehendra and Reynders-Frederix [334] и Laurence and Cotton [231], при этом выяснилось, что установка стентов бóльшего диаметра уменьшает риск воспаления желчных путей и продлевает период билиарной проходимости [105]. Со временем были разработаны различные типы функциональных билиарных стентов, такие как антимиграционные стенты, легко извлекаемые или меняющие форму стенты, стенты, обеспечивающие профилактику разрастания тканей стенки протока, стенты с лекарственным покрытием, обеспечивающие постепенное высвобождение препаратов из материала стента, радиоактивные стенты и биодеградируемые стенты [202]. Металлические или полимерные элютированные стенты с высвобождающимся лекарственным покрытием применяются, например, для предотвращения опухолевого прорастания в стент или предотвращения рестеноза [105]. Эффективность использования элютированных стентов связана с использованием сурфактантов и усилителей действия лекарств, модификацией структуры стентов, улучшением материалов для изготовления стента, методов обработки поверхности, нанесения препаратов и применения новых типов полимеров [202].

Однако дальнейший клинический опыт показал, что использование стентов также не является “серебряной пулей” и сопряжено с развитием послеоперационных осложнений. Билиарное стентирование примерно в 15% случаев приводит к ранним осложнениям (панкреатитам, перфорации, кровотечению, и более редким – холангитам и острому холециститу). Наиболее частым поздним осложнением является обструкция стента билиарным сладжем, которая наблюдается спустя 3-4,5 месяца при использовании пластиковых стентов и через 6-7 месяцев после установки металлических протезов [301].

Aikawa et al. (2007, 2010) в экспериментах на свиньях использовали заплаты из биодеградируемого поли(D,L-лактид-со-ε-капролактона) (50:50), усиленного волокнами PGA, для закрытия дефекта желчного протока веретеновидной формы (2 см × 1 см) [69, 70]. Гистологическое исследование показало, что через 5 месяцев в месте имплантации заплаты структура стенки протока была неотличима от

нормальной и покрыта эпителием, без признаков стриктуры, причем субэпителиальный слой в стенке зоны трансплантата оказался толще, чем у интактного желчного протока.

Nau et al. (2011) предложили использовать в качестве протеза желчного протока комбинированный трубчатый трансплантат из биодеградируемого материала с использованием стента, который имплантировался между концами пересеченного общего желчного протока [269]. Укутывание трансплантата прядью большого сальника показало, что если в первые месяцы отмечалось выраженное воспаление, то к 6-му месяцу трансплантат был полностью замещен соединительной тканью и покрыт однослойным цилиндрическим эпителием. Общие сроки наблюдения составили до 12 месяцев.

В работе Pérez et al. (2013) исследовалась возможность использования коллагено-агарозного геля для реконструкции желчевыводящих путей на модели свиньи. Всем животным была удалена часть желчного протока от места слияния с пузырным протоком до фатерова сосочка и на ее место вшита коллагеновая трубка, покрытая 2% агарозным гидрогелем. На 4-й неделе внешне проток был схож с естественным, наблюдалась эпителизация всей трубки, однако местами эпителий был нерегулярен. На сроках 3 и 6 месяцев полимер был неразличим и покрыт однослойным кубическим эпителием. Эпителизация происходила одинаковыми темпами с обоих концов трубки. Коллаген трансплантата был замещен плотной соединительной тканью, наружная поверхность трубки покрыта эпителием, морфологически сходным с мезотелием [287].

Исследование полноразмерных протезов внепеченочных желчных протоков из синтетических материалов с различной модификацией проводилось в основном в экспериментальных исследованиях, при этом сроки наблюдения и выборка в большинстве работ оказывались недостаточными для достоверных суждений об эффективности применения данного метода реконструкции [41]. Вследствие противоречивости результатов и отсутствия статистической достоверности результатов экспериментальных операций, в клинике данные вмешательства практически не выполнялись.

Полученные исследователями данные свидетельствуют о том, что применение билиарных стентов из биодеградируемых материалов не вызывает выраженных воспалительных изменений и гиперплазии эпителия желчного протока в области соединения стента со стенкой протока и зоной билиодигестивного соустья, а также не приводит к стойким функциональным и морфологическим нарушениям печени, способствуя восстановлению нормального эпителиального слоя в зоне повреждения после деградации стента и восстановления желчеоттока в двенадцатиперстную кишку [23]. Однако использование билиарных стентов не позволяет полностью исключить развитие послеоперационных осложнений, и не может обеспечить физиологическую совместимость трансплантата с окружающими тканями.

1.5. Обеспечение физиологической совместимости имплантируемых конструкций. Тканеинженерный желчный проток

Обеспечение физиологической совместимости имплантата означает поддержание нормальных физиологических функций замещенных тканей при сохранении биологической совместимости с окружающими трансплантат тканями. Методы тканевой инженерии, в основе которых лежит формирование конструкции органа или ткани из различных компонентов, включающих биосовместимые полимеры, клетки и биомолекулы, позволяют создавать имплантируемые конструкции, удовлетворяющие этому требованию [118].

Биосовместимые материалы, клетки и биологически активные соединения (БАС) считаются основными составляющими элементами, необходимыми при создании трехмерных конструкций для использования в регенерации поврежденных тканей [190, 229]. Подготовленные таким образом конструкции оказывают воздействие, в основном, как поддерживающие средства, которые определяют поведение клеток организма реципиента. Физико-химические свойства таких конструкций влияют на клеточную адгезию, пролиферацию, дифференцировку и синтез нативного внеклеточного матрикса (ВКМ) окружающих тканей, а также на воспалительные и иммунные реакции организма

реципиента [164]. Применение тканеинженерных конструкций (ТИК) может стать альтернативой трансплантации органов, нехватка которых ежегодно нарастает во всем мире [67], а также искусственным имплантатам, обладающим рядом недостатков и осложнений [147].

Дизайн полимерных конструкций с механическими и биологическими свойствами, подобными нативному ВКМ, способен влиять на пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток [285]. В таких конструкциях клетки не просто культивируются на матриксе или каркасе, а развиваются до трехмерных структур, которые поддерживают пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток [228]. Постепенное замещение биодеградируемых материалов каркаса ТИК собственными клетками организма пациента приводит к восстановлению органов и тканей [370]. Преимуществами ТИК с клетками пациента на полимерном каркасе, по сравнению с применяемыми трансплантациями донорских органов, являются отсутствие отторжения аллогенных трансплантатов и обусловленной этим необходимости иммуносупрессии [310].

Большинство клеток *in vivo* находятся в контакте с ВКМ – мультимолекулярной сетью, состоящей из белков и глюкозоаминогликанов [383]. Разветвленность и сложность пространственной организации матрикса непосредственно влияют на фенотип и поведение клеток [96], определяя различные аспекты поведения клеток, такие как миграция, пролиферация, дифференцировка, экспрессия генов и секреция различных гормонов и факторов роста [227]. Конструирование каркасов, подобных ВКМ по химическому составу, морфологии, и свойствам поверхности, может обеспечить успешное применение ТИК *in vivo* [236]. Материал ТИК выполняет роль временного ВКМ до восстановления или нормальной регенерации тканей организма и служит основой для культивирования клеток *in vitro* и затем пролиферации *in vivo* [242]. ТИК с заселенными клетками может быть имплантирована в область дефекта для восстановления и регенерации тканей и органов [327]. Хотя требования к характеристикам таких конструкций варьируются в зависимости от типа восстанавливаемой ткани, необходимым требованием к ним является гистосовместимость, снижающая риск развития

аллергического и иммунного ответов, приводящих к отторжению аллогенных трансплантатов [242].

В отсутствие трехмерного матрикса клетки формируют случайно организованные двумерные образования, главным образом монослой. Поэтому основной функцией каркаса является выполнение роли субстрата для адгезии клеток. Кроме того, конструкции оказывают временную механическую поддержку и направляют рост культивируемой ткани [195]. Многочисленные исследования последних лет показали, что элементы нанометрового размера, имитирующие свойства ВКМ, могут влиять на фенотипическое поведение клеток [295]. Например, наличие на поверхности волокон наноканавок индуцирует удлинение цитоскелета клеток эпителия и их выравнивание вдоль топологических особенностей поверхности контакта [360].

Большая удельная поверхность каркаса ТИК обеспечивает пролиферацию клеток не только на поверхности, но и внутри каркаса, а также эффективный обмен и выведение продуктов метаболизма [116,242]. В работе Artel et al. (2011) показано, что наличие в материале пор большего диаметра (160-270 мкм) обеспечивает активному новообразованию кровеносных сосудов по всему объему полимерного каркаса [79]. Биодеградация используемого материала ТИК позволяет исключить повторные хирургические вмешательства для удаления имплантата из организма, а также предотвратить разрастания соединительной и грануляционной ткани вокруг инертных материалов [304]. Темпы деградации при этом должны соответствовать параметрам формирования новых тканей для обеспечения поддерживающих свойств, а также барьера для доступа физиологических жидкостей [289].

Требующим особого внимания аспектом дизайна полимерных биосовместимых материалов представляется их использование в качестве носителей для эффективной и адресной доставки лекарственных средств и биомолекул. Носители лекарственных средств могут быть комбинированы с имплантируемыми конструкциями для предотвращения инфицирования в процессе восстановления и регенерации тканей. Большая удельная поверхность, характерная для полученных методом электроформования конструкций, позволяет осуществить

эффективную доставку лекарственного препарата с помощью изделий из таких волокнистых материалов за счет осаждения на поверхности волокон или инкорпорирования в объем биодеградируемого материала [330]. Однако поверхностной модификации волокон с использованием БАС сопутствуют риски избыточного высвобождения препарата. Например, такой эффект наблюдали Luu et al. (2003) в работе по успешному инкорпорированию интактных ДНК-плазмид в полимерные волокна. Молекулы ДНК были локализованы на поверхности волокон, что привело к их полному высвобождению в течение 2-х часов [246].

Слишком быстрая деградация и эрозия полимерных волокон может привести к избыточному высвобождению и препаратов, инкорпорированных в объем материала. В работе Stanković et al. (2015) высвобождение лиофилизированного лизоцима из волокон сополимера PDLA-PEG-ПКЛ наблюдалось в течение первых 5-ти дней деградации в PBS [339]. Различные темпы высвобождения инкорпорированных препаратов могут быть достигнуты путем простого изменения диаметра волокна или дозировки препарата [389], а также использования смеси биоразлагаемых полимеров с различной скоростью деградации [213].

В последнее время были получены результаты по имплантации композитных ТИК крупным лабораторным животным. Miyazawa et al. (2005) была создана композитная трубка из поли(D,L-лактид-со-ε-капролактона), усиленного волокнами полигликолида (PGA). Внутренняя поверхность трубки покрыта слоем коллагена. Для заселения конструкции были использованы аутологичные клетки красного костного мозга (КМ). Клетки адгезировались на каркас в течение 1-го часа, после чего была произведена имплантация в свинью. На сроке 6 месяцев в новообразованном желчном протоке субэпителиальная соединительная ткань была толще, чем в естественном, был сформировал гладкий однородный монослой эпителия. Параметры эпителизации не отличались у заселенных и контрольных образцов [257].

Tashiro et al. (2009) использовали непроницаемую трубку из PLCL (50:50) длиной около 10 мм и диаметром 6-8 мм, которая была введена в просвет пересеченного общего желчного протока свинье. Трубчатая конструкция была

зафиксирована биодеградируемыми монофиламентными нитями из полидиоксанона 6-0, которыми был наложен анастомоз между концами пересеченного желчного протока. Хотя одно животное погибло на 65-й день после операции, при аутопсии ни у данного, ни у выведенных из эксперимента на 180-й день животных не было выявлено расширения внутрипеченочных желчных протоков и обструкции желчного протока в месте установки трубчатой конструкции, что свидетельствует о сохранении функции желчеоттока. Трубка полностью деградировала к 6-му месяцу экспозиции [357].

Aikawa et al. (2010) в эксперименте на свинье использовали заплаты из PLCL (50:50), усиленного волокнами PGA. В стенке общего желчного протока был вырезан участок веретенообразной формы, который был закрыт веретеновидной заплатой. Эксперимент показал, что на сроке 5 недель проходимость желчного протока не была нарушена, уровень печеночных ферментов в крови был близок к норме, полимер полностью деградировал. При этом регенерации эпителия не произошло, были выражены воспалительные явления и гиперплазия соединительной ткани. На сроке 4 месяца место закрытого заплатой дефекта было неотличимо от интактного желчного протока. Интраоперационная холангиография выявила расширение места внедрения заплаты, однако внутрипеченочные желчные протоки расширены не были. Уровень печеночных ферментов в крови был близок к норме. Гистологически был обнаружен рост эпителия сходного с таковым в интактном желчном протоке. Субэпителиальный слой был толще, чем у интактного желчного протока, стриктур не обнаружено [69].

Li et al. (2012) использовали веретеновидную заплату из коллагена, покрытую основным фактором роста фибробластов (bFGF) с коллаген-связывающим доменом. На сроках 8 и 12 недель плотность капиллярной сети была ближе к естественной и значительно выше, чем при использовании заплаты без bFGF. Показано, что к 12-й неделе экспозиции структура волокон новообразованной гладкой мускулатуры была схожа с нативной [235].

В работе Zong et al. (2017) на модели свиньи исследовалась конструкция желчного протока на основе двухслойного полимерного каркаса толщиной 1 мм,

внутренний слой которого толщиной 30-130 нм был сформирован из поликапролактона (ПКЛ), а наружный – из поли(D,L-лактид-со-гликолида) (ПДЛГА) (75:25), заселенного мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга (ММСК КМ) [395]. Компактный внутренний слой трубчатой конструкции из ПКЛ получали из раствора 15% ПКЛ/тетрагидрофуран, высушивая его при комнатной температуре на стеклянном стержне под тягой. В средней части конструкции были микрочастицы желатина размером 280-450 мкм, которые затем в стеклянном цилиндре заливали раствором ПДЛГА/диоксан. Под низким давлением выпаривали добавленную воду и получали воздушные пузырьки в среднем и внешнем слоях каркаса. Заселение внешнего слоя каркасов проводили при использовании ММСК КМ человека третьего пассажа в концентрации 3×10^6 клеток/мл, предварительно обработав каркас в 70% этаноле. ММСК КМ культивировали статично в 6-луночных планшетах в течение 2 суток в стандартных условиях, 37^0 С и 5% CO_2. Клетки культивировались на каркасах двумя разными способами: в статичной среде и при перфузии среды. Плотность клеток на каркасах при перфузии через 18 дней была на 24% выше. Также исследователи пришли к выводу, что при таком способе культивирования образование ВКМ происходит быстрее. Животным в стенке общего желчного протока был сделан продольный разрез длиной 6 мм. Конструкцию с клетками и без клеток имплантировали в просвет общего желчного протока и фиксировали по концам швами с использованием нитей 6-0. Животных выводили из эксперимента на 4, 12 и 24 неделе после имплантации конструкций. На 4 неделю после имплантации не было существенных изменений; на сроке 12 недель наблюдалась существенная деградация наружного слоя при сохранном внутреннем; в течение 24-х недель практически полностью деградировал внутренний слой, проявились трещины на поверхности внутреннего слоя. Ни в одной группе экспериментальных животных не было обнаружено признаков стеноза или холестаза. К шестому месяцу исследования имплантаты, заселенные клетками, показывали лучший эффект восстановления в сравнении с незаселенными имплантатами [395].

Разработанные методы улучшения исходов хирургических операций могут быть использованы в экспериментальных исследованиях при трансплантации ТИК. Например, с целью предотвращения некробиотических и деструктивных процессов в стенке венозного трансплантата, предлагалось использование методов как предварительного консервирования [16], так и инкубирования трансплантата в клеточных культурах [359].

С целью улучшения результатов аутовенозной пластики, рядом исследователей предлагалось проведение предварительной подготовки трансплантата [265]. Так, Doillon et al. (1981) было показано, что предварительная экспозиция венозного трансплантата в глицерине улучшает исходы операции по сравнению с нативными трансплантатами [146]. В то время, как при трансплантации нативных сосудистых трансплантатов наблюдались воспалительные реакции с нарушением эндотелия и развитием грубой соединительной ткани, в предварительно подготовленных тканях воспалительная реакция и развитие грубой соединительной ткани были минимальными, быстрого отторжения эндотелия не происходило, а наблюдалось постепенное его замещение эпителием желчного протока [41].

С этой же целью улучшения результатов аутовенозной пластики О.М. Горбуновым и соавт. (1982) была предложена предварительная подготовка аутовены на погружном дренаже в питательной среде 199 [16]. В результате экспериментальных исследований на модели собак было показано уменьшение воспалительной и иммуно-клеточной реакции в трансплантате, что позволяло внутренней поверхности трансплантата полностью эпителизироваться в сроки до 1,5 месяцев. Подобные артефакты, касающиеся подготовки трансплантата, будут учтены в дальнейшем при разработке требований к витализации ТИК.

Нормальное кровоснабжение имплантированных ТИК также может быть обеспечено различными физиологическими и биологическими методами. Физиологический метод улучшения кровоснабжения зоны трансплантата путем ее окутывания большим сальником после вшивания в качестве протеза желчного протока или его стенки предложен Э.И. Гальперин и соавт. (1980) на модели

васкуляризации аутовены [10, 63]. Биологические методы улучшения кровоснабжения включают использование ангиогенных факторов роста, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), bFGF, трансформирующий фактор роста (TGF), гранулоцит-колониестимулирующий фактор (G-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор некроза опухоли (TNF), специфические интерлейкины, ангиопоэтины и другие БАС, путем инъекции в зону имплантации или использовании для модификации материалов конструкций.

Исследование билиарных трансплантатов в эксперименте сопряжено с преодолением сложностей методического характера, касающихся выполнения хирургической операции на желчных путях. Узкий просвет желчного протока делает задачу наложения швов на стенки протока очень трудоемкой, а если это удается, то впоследствии в месте сшивания концов протока формируется стриктура [45]. Внедрение в эксперимент и клиническую практику микрохирургической техники прецизионного однорядного шва без захвата слизистой оболочки и использование атравматичного монофиламентного рассасывающегося шовного материала позволяет создавать билиарные анастомозы, заживающие первичным натяжением, без образования грубого рубца и, следовательно, стриктуры [27, 160]. Хотя в различных работах были реализованы отдельные элементы ТИК желчного протока, до настоящего времени не было создано функционального конструктивного решения, позволяющего восстанавливать пересечения желчного протока после травматических повреждений и обеспечивающего физиологическую совместимость трансплантата.

1.6. Проблемы восстановления желчного протока с использованием различных нативных и искусственных материалов

Первые типовые осложнения при использовании аллогенных трансплантатов были систематизированы в работе В.П. Демихова «Пересадка жизненно важных органов в эксперименте» [20]. Сегодня к таким осложнениям относят тромбозы, эмболии, воспалительные реакции, отек, расхождение швов и кровотечения на фоне общего риска биологической несовместимости тканей. Применительно к

полым органам с эпителиальной выстилкой осложнения при имплантации ТИК могут быть выражены в разрастании грануляционной ткани в просвете органа, отсутствии эпителиальной выстилки, инфицировании зоны имплантации синтетического материала, развитии хронического воспаления, а также осложнениях, обусловленных потерей трансплантатом своих механических свойств [21, 104]. Например, рецидив стриктуры после стентирования желчного протока развивается у 20% пациентов в течение первых 2-х лет [101].

Создание биологически и физиологически совместимой конструкции желчного протока требует решения задач по предотвращению развития осложнений при имплантации такой ТИК. Накопленный к настоящему времени научно-клинический опыт позволяет отнести к числу данных задач рациональный выбор материала, выбор условий эпителизации, а также обеспечение достаточной васкуляризации имплантированной ТИК.

1.6.1. Проблема выбора материала для изготовления имплантатов желчных путей

Предпринималось множество попыток разработать удовлетворительный протез для восстановления проходимости желчных путей у пациентов с травмой общего желчного протока. В качестве материалов для пластики и дренажей испытывались ауто- и гомоартерии, аутогенные вены, твердая мозговая оболочка, круглая связка печени, кожные графты, тефлон, резина, акрилатамин, виталлий, силастик [46]. Среди пластмасс были опробованы полиэтилен, поливинил и поливиниловый спирт, однако долгосрочные результаты были малоуспешными. Ранние и поздние послеоперационные осложнения, такие как стеноз, отторжение, обтурация просвета солями желчных кислот, холангиты и поздний цирроз, сопровождали исследователей в этой области. Краткосрочные наблюдения все же были достаточно обнадеживающими, чтобы стимулировать дальнейшее изучение этой проблемы [376].

Использование новых материалов в хирургии открывало пытливым умам не только новые успешные результаты в клинической практике, но также и приводило

к ранее неизвестным осложнениям и тем самым заставляло срочно искать новые способы их исправления на всем пути развития хирургической мысли [376]. В современных работах показано, что не существует идеального хирургического материала, поскольку использование одного и того же синтетического материала *in vitro* и *in vivo* при различных условиях зачастую показывает различные исходы, не позволяя подобрать универсальный биологически и физиологически совместимый материал [283].

Используемые при создании каркасов имплантируемых конструкций материалы выполняют организующие функции в отношении клеток и внешних тканей организма, создавая искусственную «нишу» в материале конструкции *in vitro* или *in vivo* [115]. Вопрос рационального выбора материалов для создания имплантатов широко обсуждается в современной научной литературе, при этом некоторые исследователи отмечают преимущество естественных материалов [126], в то время как другие отдают предпочтение синтетическим [271, 375]. Однако последующие за научными изысканиями производство, стандартизация и клиническое использование таких медицинских изделий делает трудозатратным применение материалов нативного происхождения.

Изготовление каркаса ТИК требует использования материалов, параметры которых соответствуют тканеспецифичным требованиям, в том числе по механической прочности, биосовместимости, растяжимости и клеточной адгезии. Анализ мирового опыта создания и лабораторного исследования биосовместимых каркасов из различных материалов выявил чувствительность клеточных культур к типу и параметрам поверхности (пленка, волокнистая структура), их характерным размерам (пористость, характерный размер компонентов), а также свойствам самого материала (угол смачивания, состав продуктов деградации) [323].

Во множестве современных исследований показано, что физико-механические свойства материалов способны непосредственно влиять на внутриклеточные процессы, регулирующие адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку и метаболизм клеток [156, 344], а химический состав каркаса – на параметры биодеградации и межклеточной коммуникации [245]. Одним из

проявлений данного свойства является влияние состава и характерных физических размеров конструкций, создаваемых методом электроформования, на пролиферацию и дифференцировку клеток [129]. Показано, что на клетки оказывает влияние не только диаметр волокон, но и их направление (хаотичное/выровненное), характеристики материала и размеры пор [377], при этом скорость пролиферации и проникновение клеток в микропористые трехмерные каркасы с одинаковыми параметрами пористости и средним размером пор зависят от особенностей их пространственной организации [49]. В работе Сытиной Е.В. и соавт. (2014) было показано, что обеспечение высокого уровня пролиферации фибробластов и их миграции в объем каркаса возможно при диаметре полимерных волокон в 2–3 мкм и размере пор ~20 мкм [58], при этом диаметр волокон нативного ВКМ органов и тканей человека, как правило, составляет 260–410 нм [102].

Основным требованием к материалу конструкции билиарного имплантата, предотвращающим схлопывание и скорое развитие механической желтухи, является длительное обеспечение механической прочности. Например, в работах Mendelowitz and Beal (1982) и Ruka et al. (1987) не были получены удовлетворительные результаты вследствие перегиба и сдавливания трубок, которые приводили к нарушениям желчеоттока и функциональному холестазу [256, 307].

Использование рассасывающихся каркасов для целей регенеративной медицины – не новая стратегия, ранее известная как регенерация по аллостатическому трансплантату или рассасывающемуся каркасу [4, 30]. Регенерация по каркасу приводит к покрытию искусственных материалов адвентицией окружающих тканей за счет клеточной миграции и пролиферации [4]. Профессор Л.Д. Лиознер (1975) обращал внимание, что от регенерации по каркасу, временному или длительно установленному, следует отличать заместительную регенерацию, под которой понимался процесс постепенного вытеснения алло- или даже аутологичного трансплантата тканями реципиента с образованием недостающей части органа [33]. При использовании биодеградируемых материалов

на биосовместимость также оказывает влияние характер деградации, поскольку данный процесс является динамическим, и механические, морфологические и химические свойства материала меняются во время деградации и могут влиять на поверхностные и объемные свойства трансплантата, диффузию ферментов и низкомолекулярных соединений [111]. Поверхностная модификация полимеров также влияет на скорость деградации каркаса [294], а изменение со временем физико-химических свойств поверхности вследствие ферментативной деградации приводит к выводу о необходимости цито- и ткане-специфичного изучения совместимости имплантатов из формованных определенным образом материалов.

Терминология процессов, происходящих при биодеградации полимеров, в настоящее время неоднозначна. Мы использовали термины из работы Siepmanna and Gopferich (2001), в которой под *деградацией (деструкцией)* полимера понимается разрыв его основной цепи с уменьшением молекулярной массы, а под *эрозией* – потеря материала из полимерного изделия сопровождающее разрушение имплантата на части [29, 329]. Совместное проявление процессов деградации и эрозии мы называли *резорбцией* материалов.

Наиболее часто в качестве биосовместимых и биодеградируемых материалов используются ПКЛ, PLA, PGA и их сополимеры с различными свойствами биодеградации. Например, молочная кислота, высвобождаемая при деградации поли-L-лактида (PLLA), снижает pH и ускоряет скорость деградации из-за автокатализа, что приводит к образованию высококислой среды вокруг полимера, снижающей цитосовместимость материала. ПКЛ, напротив, медленно деградирует путем гидролиза сложноэфирных связей с удалением образующихся фрагментов макрофагами и гигантскими многоядерными клетками инородных тел (ГМКИТ) [323]. В таблице 1.1 приведены результаты использования различных биодеградируемых и биосовместимых материалов на крупных лабораторных животных при восстановлении проходимости желчных путей.

Таблица 1.1 Опыт использования различных биодеградируемых и биосовместимых материалов для создания имплантатов желчного протока

Материал	Модель	Особенности при имплантации *in vivo*
ПКЛ	Свинья	Материал физиологически совместим. Отличается длительными сроками биодеградации. Поддерживает миграцию клеток и эпителизируется in vivo.
ПДЛГА / PLLGA	Свинья	Материал физиологически совместим. Не вызывает острого воспаления. Отличается короткими сроками биодеградации.
PLCL	Свинья	Материал физиологически совместим. Не вызывает острого и хронического воспаления.
Коллаген	Свинья	Материал физиологически совместим, но не способен нести механические нагрузки.

Анализ результатов экспериментальных операций по имплантации синтетических материалов показывает, что ПКЛ, PLCL и ПДЛГА являются приемлемыми материалами-кандидатами для использования при создании каркаса ТИК желчного протока, поскольку они физиологически совместимы, длительно сохраняют механические характеристики при имплантации, а их удельные свойства по биодеградации различаются и позволяют формировать композитные конструкции с различными темпами деградации.

Можно сделать предположение о *минимально необходимых и достаточных параметрах* совместимости материала, связанных с отсутствием выраженной цитотоксичности, наличием требуемых механических свойств и параметров биодеградации. В данной парадигме основным критерием при выборе материалов должно стать отсутствие выраженной цитотоксичности и обеспечение физиологической биосовместимости. Можно сделать вывод, что необходимым требованием к каркасу ТИК является отсутствие цитотоксичности материала с конкретными физико-химическими характеристиками для тканей в зоне имплантации (тканеспецифичная совместимость), а достаточным требованием – физиологическая совместимость, которая может быть достигнута включением в материал репертуара БАС или иных витализирующих агентов.

1.6.2. Проблема эпителизации нативных и искусственных трансплантатов

Обеспечение эпителизации имплантируемых материалов является одной из ключевых задач для исключения развития поздних послеоперационных осложнений. Проблема неполной эпителизации поверхности трансплантатов связана с особенностями патологической регенерации поврежденных эпителиальных тканей, которая сопровождается нарушениями нормального кровоснабжения и нормальной структуры соединительной ткани.

В литературе отмечается, что использование небиодеградируемых материалов позволяет в некоторых случаях добиться эпителизации биосовместимого материала за счет наползания на материал нормальной соединительной ткани. Например, К.Г. Хаспековым-Терпаносяном в экспериментах по замещению циркулярных дефектов общего печеночно-желчного протока на собаках было показано, что при использовании вставок из тефлона при длительной экспозиции (до 1,5–2 лет) вокруг протеза наблюдалось образование оболочки из соединительной ткани, внутренняя часть которой покрывалась эпителием [41,62]. Аналогичные результаты были получены в экспериментальной работе Hartung et al. (1978) на собаках, в которой спустя 4 недели после имплантации наблюдалась эпителизация как тефлоновых протезов, так и заплат, при этом стеноз желчного протока не наблюдался на сроках 2-х лет [186]. Согласно Boguth et al. (1994) при использовании металлических билиарных стентов эпителизации не происходит до первых 3–6-х месяцев после установки, затем образуется грануляционная ткань, рекрутируются гигантские многоядерные клетки, и ткань врастает через открытые пространства стента [106]. Однако в литературе не удалось найти успешных работ, в которых бы наблюдалась эпителизация внутренних поверхностей резиновых и цельнометаллических трубок, используемых в качестве протезов желчного протока.

Одним из аспектов патологической регенерации является физиологическое воздействие желчи на окружающие ткани. В месте анастомоза желчь раздражает ткани и стимулирует выраженную фиброзную реакцию, которая напоминает

образование келоидов и может приводить к образованию стеноза [167,221]. Некоторыми авторами даже при использовании аутологичных тканей указывается на необходимость иссечения соединительной ткани на конце петли тонкой кишки для предотвращения её контакта с желчью и последующего формирования рубца [221]. Таким образом, недостаточная эпителизация может индуцировать образование хронического стеноза вследствие физиологической реакции соединительной ткани на агрессивную среду желчи.

Экспериментальные исследования нативных тканей, проведенные Э.И. Гальпериным и соавт. (1980), показали, что при пластическом замещении желчного протока васкуляризированным аутовенозным трансплантатом эндотелий на участке пересадки не образуется даже через 2 года после операции [10]. Эпителизация по линии билиодигестивного анастомоза отмечена только через 1,5-2 года после проведенной операции [10,12]. Факторы, определяющие интенсивность и сроки эпителизации и образования соединительнотканного каркаса поврежденных участков стенки желчного протока, как были не до конца изученными ранее [63], так остаются и сегодня.

Ismail (2009) из Университета Айн-Шамс показал, что при циркулярных дефектах желчного протока у собак лучшие результаты получаются при использовании недецеллюляризованного амниона, обернутого васкуляризированным лоскутом брюшины. По результатам 6-недельной морфологии показано отсутствие воспалительной реакции и нарастание эпителия на амниотическую оболочку [198].

Yamamoto et al. (2011) в исследовании по стентированию билиарными стентами из PLLA выявили важную проблему снижения со временем проходимости стентированных таким способом желчных протоков. В случае, если стент сохранялся в организме спустя 6 месяцев после имплантации, наблюдалась прогрессирующая пролиферация эпителиальных клеток и зарастание стента в 75% случаях. Кроме того, по завершению исследования спустя 9 месяцев во всех случаях наблюдалась фрагментация стента [384].

Первой работой, заложившей основы для направленной клеточной инженерии эпителиального компонента желчного протока, было исследование Barralet et al. (2003) по созданию *in vitro* конструкции на основе комбинированного каркаса на основе поли(гликолид-со-ε-капролактона), на котором получали слой ЭКЖП человека [91]. Было показано, что применение изделия «Матригель» (матрикс базальных мембран, экстрагированный из EHS саркомы мыши) способствует адгезии эпителиальных клеток на поверхности полимерного материала. Однако данный метод композитной модификации материалов не является приемлемым, поскольку «Матригель» производят из неочищенного ВКМ с неизученным составом факторов роста и цитокинов. Важным моментом в этой работе была демонстрация долговременного (более 6 месяцев) выживания ЭКЖП человека на синтетических каркасах с сохранением клеточного фенотипа.

Научная группа Miyazawa et al. (2005) из Медицинской школы Сайтама представили результаты трансплантации ТИК желчных протоков гибридным свиньям. Конструкция представляла собой трубку длиной 30 мм, диаметром 5 мм с толщиной стенок 1 мм, состоящую из волокнистого PLCL с заселенными некультивированными мононуклеарами КМ (образцы контроля – без клеток). Через 6 и 10 недель после имплантации наблюдали незавершенную эпителизацию конструкции. На сроках 6 месяцев получали идентичную по морфологии конструкцию желчного протока, но с менее выраженным соединительнотканным слоем. Верификацию ЭКЖП проводили окрашиванием на CK-19 [257]. Стоит отметить, что эпителизация в данной модели не зависела от наличия на каркасе клеток КМ, свидетельствуя, что заселенные клетками каркасы не имели преимуществ, так как эпителизация может быть достигнута миграцией клеток из соседних областей. Также, полученные результаты могут свидетельствовать высоком естественном потенциале нарастания ЭКЖП на дистанции более 1 см.

Продолжением работ по ТИК было описанное выше исследование Zong et al. (2017), в котором применяли двухслойную конструкцию на основе ПКЛ/ПДЛГА, заселенную ММСК КМ человека. На срок 4 недели в группе животных с имплантированными ТИК, в отличие от группы с каркасами без клеток, была

обнаружена реэпителизация. ММСК КМ при этом сохраняли свою жизнеспособность на каркасе при микроскопии с окраской антителами против HuNu. Эпителизация в группе с бесклеточным каркасом наступала значительно позднее, на 12-й неделе после имплантации [395].

Общие при восстановлении эпителиальных органов проблемы связаны с регулированием эффективности реэпителизации и иных репаративных процессов путем организации соответствующего микроокружения [290]. Разрешение проблемы эпителизации конструкции сопряжено с изучением механизмов поддержки миграции эпителиальных клеток, которое в норме происходит с определенным диапазоном линейной скорости (как правило в диапазоне до 1–2 мм в неделю), в зависимости от внешних условий. Одним из вариантов решения задачи стимулирования пролиферации эпителиальных клеток может быть применение специфических БАС, например факторов роста EGF, bFGF, TGF-a, HGF и IGF [142].

1.6.3. Проблема васкуляризации имплантированного материала

Использование нативных или искусственных материалов при отсутствии должного местного кровоснабжения вызывает развитие у реципиента клинической картины, которая приводит к необходимости выполнения повторной операции вследствие разрастания рубца, либо использования интенсивной антибиотикотерапии, и в некоторых случаях может заканчиваться смертью [21, 42, 207].

В XIX веке знаменитым немецким хирургом, военным врачом и писателем Рихардом фон Фолькманом было установлено, что максимум 3-мм кусочки мышечных тканей при их имплантации могут существовать в благоприятной среде без собственной сосудистой сети и нормального кровоснабжения [30, 371, 372]. Однако ткани желчных путей по сравнению с тканями кожи и мышц показывают намного большую чувствительность к интенсивности кровоснабжения вследствие более высокой интенсивности транспорта растворенных веществ и митохондриального дыхания в эпителиальных клетках [270].

По своей организации кровоснабжение полых органов схоже с системой vasa vasorum стенок кровеносных сосудов. Кровоснабжение желчных протоков обеспечивается тонкими сосудами от прилегающих артерий. Сосочек и сфинктерная часть общего желчного протока присоединены к ветвям задней поджелудочно-двенадцатиперстной аркады, в остальном общий желчный проток питается мелкими сосудами от соседней печеночной артерии и от ее ветвей — правой печеночной артерии и ретродуоденальной артерии. Каждый мелкий сосуд снабжает лишь определенный сегмент протока, однако эта связь ненадежна, и даже незначительная изоляция протока может стать причиной некроза его стенки [99]. Вдоль латеральной стенки общего желчного протока проходят артериолы, формируя структуру осевого кровоснабжения [272]. Осевое кровоснабжение является асимметричным – 60% кровоснабжения общего желчного протока осуществляется артериолами, идущими снизу-вверх от гастродуоденальной артерии, и 38% – артериями, идущими сверху-вниз и являющимися ветвями правой печеночной артерии. Вены, по которым происходит отток крови от желчных протоков, как правило, сопровождают артерии и проходят вдоль стенки общего желчного протока [43, 273].

В работах Terblanche et al. (1983), Lillemoe (1997) и В.М. Копчак и соавт. (2011) была подробно изучена схема кровоснабжения желчного протока человека, в общем виде представленная на рисунке 1.3. Помимо общих анатомических элементов на рисунке показан один из элементов вариантной анатомии билиарного древа – суправезикулярный проток.

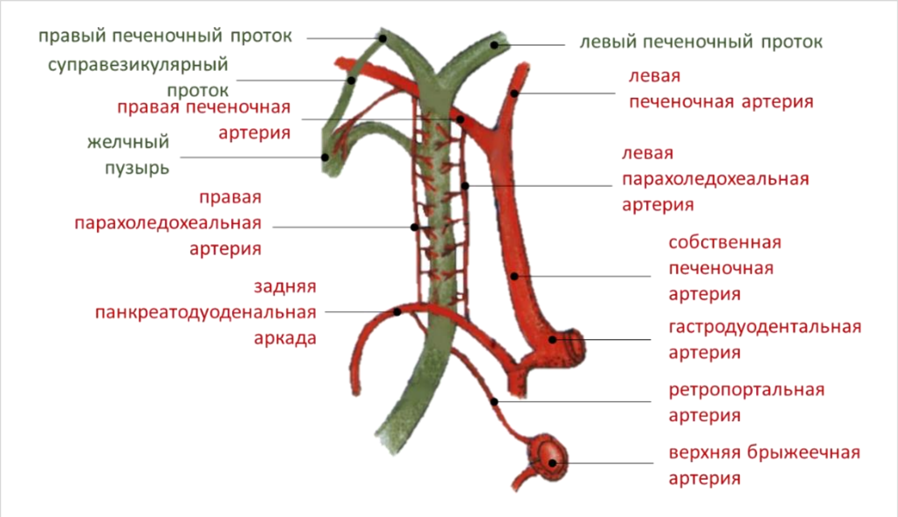


Рисунок 1.3 Схема кровоснабжения общего желчного протока

В современных работах отмечается, что желчные протоки очень чувствительны к ишемии [262, 347]. Действительно, недостаточное кровоснабжение через ветви печеночной артерии и перибилиарного сосудистого сплетения приводит к ишемической холангиопатии, которая представляет собой одно из наиболее распространенных осложнений после трансплантации печени или травм желчного протока [141]. Необходимость сохранения сосудов желчного протока для предотвращения развития ишемии отмечается в качестве одного из важных факторов успешного проведения гепатобилиарных вмешательств [63]. Shapiro and Roblllard (1948) было отмечено, что нарушение артериального кровоснабжения желчного протока приводит к развитию стриктуры [326], что в дальнейшем было подтверждено и в клинических наблюдениях [179]. По всей видимости образование стриктуры происходит по причине деградации эпителиального слоя вследствие недостаточного кровоснабжения. Следовательно, обеспечение кислородом и питательными веществами через достаточно васкуляризированную строму необходимо для долгосрочной выживаемости ТИК желчных протоков [208]. Интенсивность васкуляризация зоны трансплантата влияет на многие физиологические процессы (Рис. 1.4).



Рисунок 1.4 Влияние роста сосудов на физиологические процессы в зоне имплантации

Снижение местного кровоснабжения (ишемия) со временем приводит не только к дисфункции ткани, но и развитию бактериальной инфекции. Например, ишемия полых эпителиальных органов способствует прекращению экспрессии лизоцима во вновь образованном эпителиальном слое. Поскольку лизоцим – антибактериальный агент, разрушающий клеточные стенки бактерий путем гидролиза муреина, то его дефицит приводит к развитию местного очага острой бактериальной инфекции [7].

Традиционно считается, что необходимым требованием к имплантируемым ТИК является снабжение всех клеток ткани в такой конструкции достаточным количеством питательных веществ, для чего клетки должны находиться на расстоянии не более 200 мкм от сосуда. Указанная величина обычно рассматривается как предел возможной диффузии кислорода и питательных веществ в ткани [201, 268]. Поэтому создание сосудистых сетей остается ключевой проблемой в тканевой инженерии при изготовлении объемных тканевых конструкций и тканей толщиной более 400 мкм, которые требуют наличия сосудистой сети для доставки метаболитов и удаления продуктов жизнедеятельности [85]. Без такой сосудистой сети плотнозаселенные ТИК демонстрируют физиологически недостаточную метаболическую активность клеток, могут образовывать некротические зоны и ограничены по своей функциональности. Для решения этой проблемы предлагаются методы

васкуляризации конструкций, основанные на клеточном сокультивировании и специальной обработке материалов.

Обработка венозных трансплантатов в различных средах (например, среде 199) приводит к деградации эндотелия и утолщению стромы [385]. Обработанные таким образом аутовены в экспериментальных исследованиях показывали лучшие результаты по сравнению с нативными за счет уменьшения воспалительной и иммуно-клеточной реакции, причем внутренняя поверхность обработанных трансплантатов эпителизировалась в сроки до 1,5 месяцев [17].

Недавние исследования в области анатомии стенки эпителиальных органов показали выделение нового компонента – сети лимфатических канальцев (интерстиций) на расстоянии 60-70 мкм от просвета, которые предположительно несут функцию поддержания иммунологического гомеостаза эпителиальных клеток и формируют микроархитектонику многослойной структуры стенки желчного протока [98].

Формирование сосудистой сети посредством модификации синтетических материалов является активным полем для современных разработок [173, 218], в котором используются различные методы модификации материала, например поверхностная или объемная модификация БАС [173], предварительное заселение материала клетками [173, 321] и другие методы. Поскольку морфогенез кровеносных сосудов находится под контролем многочисленных паракринных факторов, например bFGF и VEGF [176], то они могут быть включены в состав материала при его поверхностной или объемной модификации БАС. Выбор конкретных параметров васкуляризации трансплантата в настоящее время остается нерешенной задачей тканевой инженерии [325].

1.6.4. Проблемы тканевой инженерии функционализированных имплантатов для замещения поврежденных желчных путей

Тканевая инженерия на сегодняшний день представляет хотя и не новую, но все же многообещающую концепцию репарации или замещения поврежденных органов и тканей, применение которой уже возможно на практике [229, 277]. В

данной концепции трансплантат представляет собой тканевую конструкцию, созданную *ex vivo*, и состоит из клеток на биосовместимом каркасе, который приживается и поддерживается в организме реципиента [8]. На сегодняшний день существует ряд успешных клинических примеров применения ТИК в клинической практике [124, 145, 299], а также множество экспериментальных работ на модельных животных [114, 177, 336]. Общее этапы создания тканеинженерного органа *in vitro* представлены на рисунке 1.5.



Рисунок 1.5 Этапы создания модели тканеинженерного органа *in vitro* (по Caddeo et al., 2017) [118]

Методы тканевой инженерии позволяют обеспечить не только персонифицированный подход к реконструкции органов и тканей (за счет использования собственных клеток пациента), но также и реализовать функциональный подход к обеспечению нормальных физиологических процессов. Использование препаратов в составе материалов конструкций позволяет контролировать доставку и выход лекарственных средств, обеспечивая их пролонгированное воздействие.

Полученные методами электроформования, трехмерной печати или стереолитографии каркасы ТИК могут быть использованы для изготовления различных структур, в первую очередь листовой или трубчатой формы. Имплантация таких конструкций в организм сопровождается последовательными фазами тканевого ответа, приведенными на рисунке 1.6.

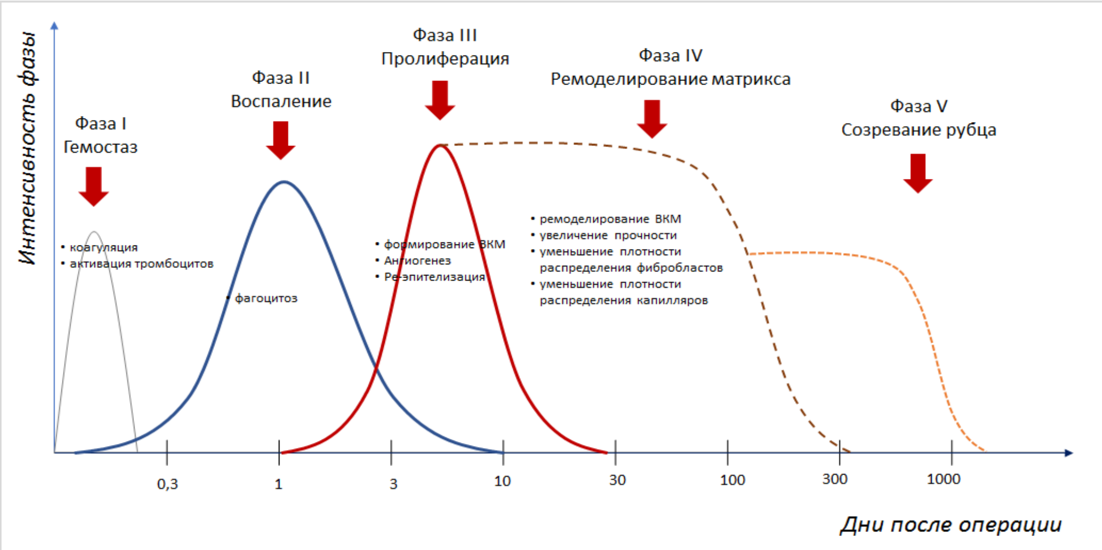


Рисунок 1.6 Фазы заживления при имплантации материала *in vivo*. Адаптированный рисунок приводится по Clark (1991), Enoch and Leaper (2008) и Brugmans (2015)

Физиологический ответ на имплантированный материал нативного или искусственного происхождения может быть в общем виде представлен в виде пяти последовательных стадий (фазы I-V).

Фаза I. Гемостаз (до нескольких минут). После начала взаимодействия материала с кровью, белки из крови и интерстициальной жидкости адсорбируются на материале в зависимости от свойств его поверхности, и служат сайтами связывания для лейкоцитов [75, 164]. Тромбоциты также адсорбируются на материал и секретируют хемоаттрактанты для привлечения иммунных клеток, которые участвуют во второй, воспалительной, фазе [111].

Фаза II. Острое воспаление (от нескольких минут до нескольких дней). На ранней фазе острого воспаления наблюдается миграция нейтрофилов из крови к

имплантированному материалу. Через 24-48 часов нейтрофилы подвергаются апоптозу и фагоцитируются резидентными тканевыми макрофагами. Далее моноциты мигрируют к месту имплантации материала и дифференцируются в макрофаги, которые удаляют остатки клеток и инородные материалы [111].

Фаза III. Пролиферация (от нескольких дней до нескольких недель). Через 3-5 дней фибробласты, которые рекрутируются макрофагами, мигрируют к месту имплантации и начинают экспрессировать белки ВКМ, такие как фибронектин, коллаген и протеогликаны. Кроме того, во время этой фазы регенерации эндотелиальными клетками формируются новые кровеносные сосуды в новообразованной ткани [111].

Фаза IV. Ремоделирование (от нескольких недель до года). При ремоделировании происходит выведение макрофагов. При нормальном заживлении каркас полностью деградирует и фагоцитируется клетками, тогда как ВКМ одновременно синтезируется, созревает и ремоделируется, обеспечивая достаточный уровень васкуляризации. Конечный результат регенерации ткани или образования рубца зависит от продолжительности хронической воспалительной фазы, так в случае продолжительного заживления образуется волокнистая рубцовая ткань. Считается, что ГМКИТ играют важную роль в этом длительном заживлении, так как они непрерывно активируют фибробласты, что приводит к чрезмерной экспрессии компонентов ВКМ [164], и как следствие – инкапсуляции оставшейся части каркаса сосудистой волокнистой соединительной тканью вместо полной резорбции каркаса и его полным замещением нативной тканью [109].

Фаза V. Созревание рубца (от полугода до нескольких лет). При созревании рубцовой ткани со временем может происходить образование грубого соединительнотканного рубца, зачастую являющегося причиной механической несостоятельности матрикса или развития стеноза.

Снижение рисков во время каждой фазы физиологической реакции на имплантированный материал может достигаться путем улучшения биологической и физиологической совместимости трансплантата с морфологическими и функциональными параметрами нативных тканей [66, 71], что обычно достигается

подбором материала и формованием каркаса, выбором источника и условий культивирования клеток, а также различными способами васкуляризации конструкции [66].

Физиологическая совместимость конструкции зависит не только от используемого биосовместимого материала и свойств используемых клеток, но также и от структурной организации. Ранние представления о том, что только лишь тщательно подбирая материалы, клетки и БАС, можно добиться успешного создания полностью функционального трансплантата исключительно за счет активации репаративных процессов в организме, по-видимому, не получили своего подтверждения [311]. Разработка функциональных ТИК в настоящее время связана с реализацией концепций «искусственной ниши» [249] и «искусственного межклеточного сигналинга» [217], которые связаны с приданием конструкции подобия аффекторным признакам живого организма. Модификация материала нативного или искусственного происхождения для обеспечения условий миграции, пролиферации и дифференцировки клеток *in vivo* для обеспечения функционализации трансплантата называется *витализацией,* и может быть достигнута при использовании БАС и клеток [323, 358].

Воссоздание биологической сложности естественных живых тканей может быть достигнуто посредством использования полостей тела в качестве биореактора для *функционализации* ТИК. Данный подход получил название префабрикации и предусматривает трансплантацию заготовок органов (*organ bud*) в виде мало- или нефункциональных тканей будущего органа для последующей инкубации (эндокультивирования и васкуляризации) *in vivo* или *in vitro* [355]. В рамках такого подхода возможно создание витализированного *in vitro* материала, функционализация которого в ткани желчного протока происходит уже после имплантации в результате естественных восстановительных процессов при воздействии БАС или клеток за счет активации специфического хоуминга, ремоделирования ВКМ и формирования специфического микроокружения.

Основные факторы функционализации ТИК желчного протока, обеспечивающие нормальное восстановление тканей, представлены на рисунке 1.7.

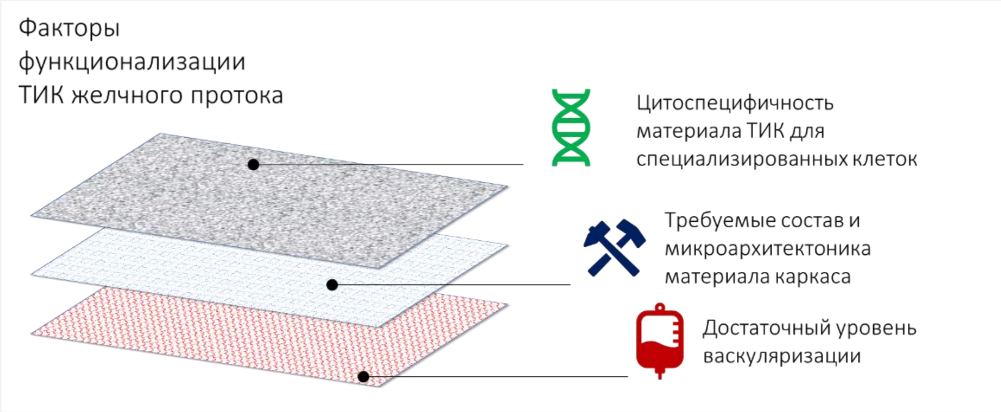


Рисунок 1.7 Основные факторы функционализации ТИК желчного протока

Аналогичная концепция, получившая название “регенеративной хирургии”, была предложена русским хирургом и травматологом, профессором И.А. Голяницким (1922). Было обнаружено, что при имплантации органов или тканей пересаживаемый материал вызывает репаративные процессы со стороны тканевого ложа [15]. Трансплантат стимулирует регенеративный процесс или же обеспечивает саму возможность восстановления какого-либо органа по своеобразному каркасу, организм самостоятельно постепенно замещает чужие структуры своими собственными [30]. При этом положительный результат может отмечаться даже при использовании не-биодеградируемых материалов, предварительно имплантированных в организм для формирования тканевого покрытия. Brinkley et al. (1947) производили замену сегмента общего желчного протока трубкой из танталовой сетки, предварительно имплантированной в прямую мышцу живота для получения фасциального покрытия сетки. Далее полученная конструкция анастомизировалась между общим протоком и тонкой кишкой, что приводило к эпителизации трансплантата [103].

Понимание необходимой структуры биоинженерных эквивалентов органов развивалось с ростом понимания механизмов взаимодействия клеток и материалов как *in vitro*, так и *in vivo* [135, 190]. Функциональный дизайн трехмерных подложек, отвечающих требованиям адгезии к клеткам, все еще очень сложен для воспроизведения и требует понимания параметров, которые влияют на поведение

клеток *in vitro* и *in vivo* [247]. Предотвращение развития ранних и поздних послеоперационных осложнений, которые могут повлечь за собой снижение качества жизни и гибель пациента, требует использования принципиально новых и улучшенных подходов к модификации имплантируемых материалов для обеспечения их биологической и физиологической совместимости.

Эффективность использования данного подхода по улучшению исходов восстановительных операций была продемонстрирована в экспериментальной работе Li et al. (2012), в которых были показаны различия физиологической картины в случаях отсутствия биологической активации конструкции желчного протока, и в случае модификации материала конструкции белковыми факторами роста [235]. При использовании клеточного покрытия также отмечалось снижение воспалительной реакции окружающих имплантат тканей [395].

Помимо применения белковых факторов роста и клеточных культур, обеспечение витализации конструкций трансплантатов может быть достигнуто с использованием ген-активированных материалов [6]. БАС могут быть доставлены в клетки вместе с продуктами деградации каркаса, наночастицами, липосомами или РНК-белковыми комплексами [280]. В экспериментальных работах по биологической активации материалов для стимулирования пролиферации клеток ранее были использованы транскрипционные факторы генов Sox2, Sox17, ростовые факторы EGF, FGF7, bFGF и эритропоэтин [128]. При этом использование сложного состава белковых соединений сопряжено с рисками развития иммунного ответа на используемые компоненты. Предлагаются и другие варианты витализации ТИК с использованием генноинженерных iPS-клеток, 3D-биопечати на основе структурированных клеточных органоидов, модификации материалов с использованием систем редактирования генома на основе эндонуклеаз, а также материалов для модулирования специфичных клеточных реакций, например эпителиально-мезенхимального перехода [382]. Особое внимание заслуживают материалы, связывающиеся с клетками для их иммобилизации или доставки в клетку терапевтического агента [86]. Представляется перспективным

использование таких материалов для захвата малодифференцированных эпителиальных клеток непосредственно из желчетока [337].

В 1855 году Рудольф Вирхов сформулировал принцип целлюлярной патологии, согласно которому любая болезнь может быть сведена к поражению соответствующих клеток [369]. Последовавшие в дальнейшем исследования в области патологической анатомии и физиологии скорректировали представление о поиске природы заболеваний в область сопоставления морфологических особенностей тканей с результатами терапевтических и хирургических вмешательств [222, 281]. Подобные актуальные представления о морфофункциональной частной патологии могут быть использованы для систематизации патофизиологических процессов при нарушении функций желчеоттока в желчных путях. При этом в качестве морфофункциональных пространственных единиц в данном случае могут быть идентифицированы слои в стенке желчного протока (Рис. 1.8).

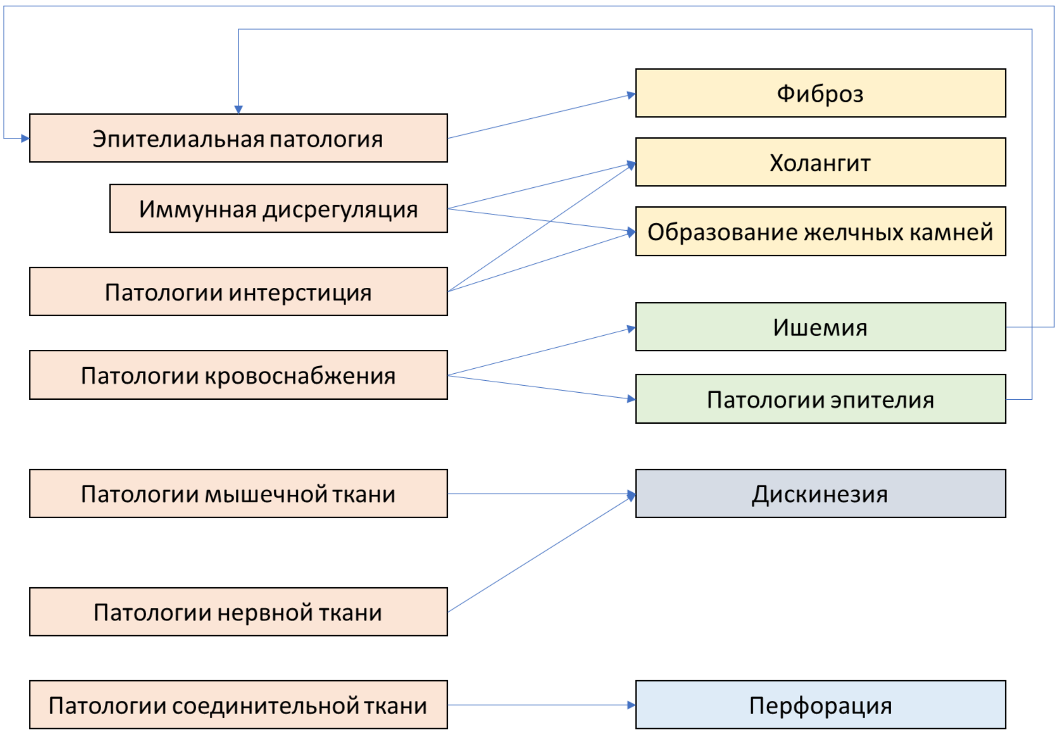


Рисунок 1.8 Систематизация патофизиологических процессов, сопровождающих нарушения нормального желчеоттока

Многочисленные работы по морфологическому исследованию структуры стенок органов билиарной системы (желчных пузыря и протоков) выявили несколько анатомических слоев, каждый из которых состоял из клеток определенного типа и носил специфическую функцию по обеспечению нормального желчетока. Среди данных слоёв, представленных на рисунке 1.9, особо выделяются основной монослой эпителиальных клеток (холангиоцитов), сеть кровеносных сосудов, гладкомышечные клетки, нервная сеть и окружающая проток серозная оболочка [214].

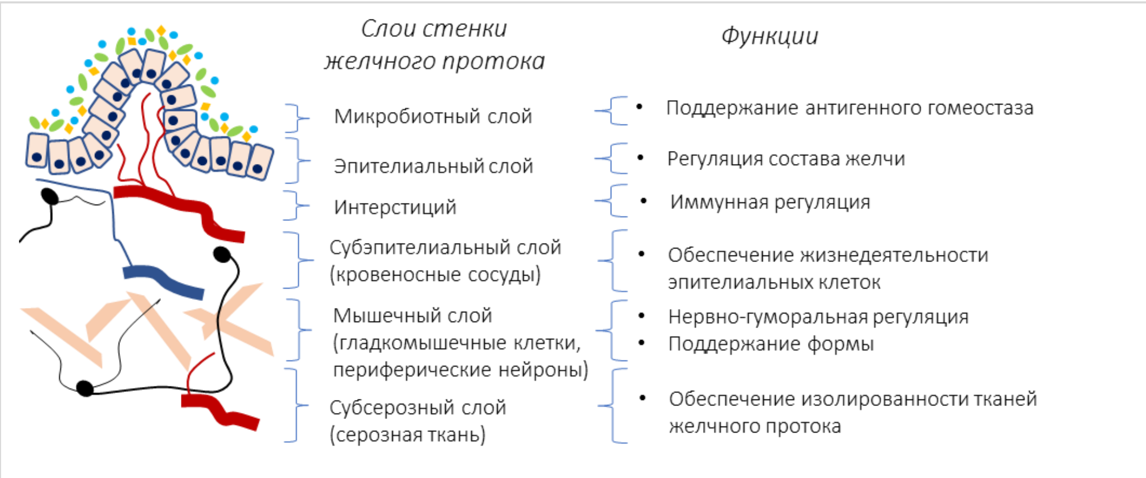


Рисунок 1.9 Функциональная анатомия стенки желчного протока

Наличие подобной многослойной структуры стенки желчного протока позволило предположить о различных вкладах и значениях каждого слоя в развитие патологических послеоперационных процессов. Многослойная конструкция желчного протока, в которой каждый слой несет собственную функцию и взаимосвязан с другими слоями, наилучшим образом отвечает принципам биомимикрии и может обеспечить функции трансплантата на более высоком уровне, чем возможности современных билиарных стентов. Сложность организации межтканевых взаимодействий *in vivo* в настоящее время не позволяет заранее определить основные параметры взаимосвязей слоев в такой конструкции [168], возможно за исключением критически значимых различий в уровне васкуляризации как одного из механизмов межтканевого сопряжения [298].

1.7. Проектирование ТИК для замещения поврежденных тканей и органов

В настоящее время не существует единого подхода к созданию биоинженерных органов и дизайну ТИК для замещения нативных тканей [144]. Правила разработки и клинического использования биомедицинских изделий для регенеративной медицины только еще находятся в процессе своего создания [185], однако в последнее время появляется все больше работ, посвященных проблемам дизайна ТИК в зависимости от целевого назначения [118, 276]. Существующий на сегодняшний день опыт проектирования биоинженерных устройств в основном связан с расчетами физико-механических параметров конструкций из выбранных материалов [363], моделированием паттернов клеточной организации органов и тканей [51], предсказанием свойств новых материалов [144], а также подбором условий для реализации программируемого синтетического морфогенеза [368]. При этом инженерно-проектные методы при создании и предсказании свойств биологических объектов в гораздо большей степени применимы к макрообъектам вследствие их большей степени устойчивости к стохастическим изменениям [341]. Тем самым функциональное проектирование на уровне логических элементов и физическая реализация могут быть осуществлены на уровне органа с большей надежностью и предсказуемостью, чем на уровне единичной клетки [238].

Подобный подход был предложен в работе Traversa et al. (2008), в которой проблему физиологической совместимости и функционализации трансплантата предполагалось решать путем изменения поверхностных свойств и морфологии волокнистого материала на различных уровнях тканевой организации для регулирования васкуляризации, клеточной адгезии и экспрессии компонентов ВКМ [363]. Практическая реализация данного подхода была предложена в работе Velasco et al. (2015), в которой функционально связывались свойства моделируемых нативных тканей с характеристиками получаемого *in vitro* биодеградируемого материала [367].

Мы предположили, что проектирование ТИК необходимо осуществлять не анатомически эквивалентными, а физиологически совместимыми нативному органу, и воспользовались элементами функционального дизайна, которые уже показали свою результативность при создании сложных технических средств. Среди существующих подходов требованиям функционального дизайна удовлетворяет методология SADT (Structured Analysis and Design Technique – метод структурного анализа и проектирования) – одна из самых известных и широко используемых на сегодняшний день методик проектирования, используемая для проектирования функциональных технических систем [303]. В отношении разработки ТИК данная методология может быть структурирована на отдельные элементы, представленные на рисунке 1.11, причем создание образца ТИК желчного протока охватывает элементы 1-4 данной методологии.



Рисунок 1.10 Метод структурного анализа и проектирования ТИК

Использование методологии проектирования ТИК можно проиллюстрировать на экспериментальном материале метода электроформования каркасов ТИК. Полученные методом электроформования конструкции из

синтетических материалов способны поддерживать рост клеток из различных источников. Например, фибробласты мыши на нановолокнах из PLLGA прикрепляются и растут согласно ориентации волокна [236]. Аналогичные результаты получены для гладкомышечных и эндотелиальных клеток в случае конструкций из PLCL (75:25) [258], что демонстрирует не только биосовместимость нановолокон с клетками, но и возможность их использования для обеспечения клеточной пролиферации.

В работах Yoo (2012) и Uth et al. (2017) описываются стратегии проектирования и расчета параметров синтетических каркасов, по своим физико-механическим и пространственным свойствам идентичных нативным тканям [365, 387]. Однако данные подходы не учитывают изменения свойств таких конструкций после имплантации, а также физиологическую реакцию тканей.

В работе Couet et al. (2007) были сформулированы требования к физико-механическим свойствам имплантированной ТИК из биодеградируемого материала в форме ограничения минимальной прочности материала конструкции и нарастающих на неё тканей реципиента $\sigma_{импланта}(t)+\sigma_{ткани}(t)\geq\sigma_{min}$ [133]. Хотя данный подход и был направлен на динамическое обеспечение совместимости физико-механических свойств конструкции, однако не учитывал требования физиологической совместимости и функционализации материала.

Функционализация трансплантата может быть достигнута при обеспечении необходимого физиологического ответа организма под действием специфических сигнальных молекул или использования конструкционных материалов. Подобные трансплантаты могут быть получены на основе композитных конструкций, созданных методом электроформования при последовательном прядении слой за слоем растворов различных полимеров, в которых каждый такой слой предназначен для специфической клеточной адгезии, способен нести конструкционные функции и использоваться для пролонгированного высвобождения БАС [264]. В работе Brugmans (2015) показано, что помимо использования различий в динамике биодеградации материалов, физико-химические би-свойства композитной конструкции могут быть достигнуты за счет

использования материалов, выборочно деградирующих путем ферментативного гидролиза или воздействием продуктов активных форм кислорода [111]. На этом эффекте может быть основана стратегия создания ТИК, использующая специфические свойства композитного материала, в котором применяются материалы с различной кинетикой деградации для высвобождения инкорпорированных БАС и изменения конструкционных свойств.

Заключение по Главе 1

Используемые на сегодняшний день методы восстановительных и реконструктивных операций на желчных путях приводят к развитию ранних и поздних послеоперационных осложнений, таких как стенозирование, отторжение, обтурация просвета солями желчных кислот, холангиты и фиброзирование вызываются нарушением кровоснабжения желчного протока, воздействием агрессивной среды желчи, которые приводят к гибели эпителиальной выстилки и нарушению анатомической целостности. В настоящее время не разработана оптимальная методика хирургического восстановления повреждений общего желчного протока, которая бы нивелировала патофизиологические механизмы развития послеоперационных осложнений. Проведенный литературный обзор выявил, что приемлемыми биосовместимыми материалами для создания каркасов ТИК являются такие полимеры как ПКЛ, ПДЛГА и PCLC. Использование заселенных клетками ТИК обладает рядом потенциально неоспоримых преимуществ перед иными способами восстановления нормального желчеоттока, вместе с тем на данный момент отсутствуют общепризнанные эффективные подходы к функциональному дизайну ТИК желчного протока. Разработанные ранее ТИК желчного протока обладают рядом физиологических несовершенств, связанных с подбором и модификацией материалов, выбором уровня васкуляризации и параметров витализации для обеспечения биологической и физиологической совместимости, наличие которых позволило сформулировать цели и задачи настоящей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая характеристика экспериментальных материалов и методов исследования

Решение поставленной задачи получения и исследования компонентов для создания многослойного композитного каркаса осуществлялось по трем основным направлениям: 1) формование композитного каркаса с требуемыми параметрами биологической и физиологической совместимости, 2) модификация материала с помощью БАС для получения витализированного каркаса, 3) разработка способа витализации каркаса с использованием выбранных типов клеток.

Общая структура работ приведена на рисунке 2.1.

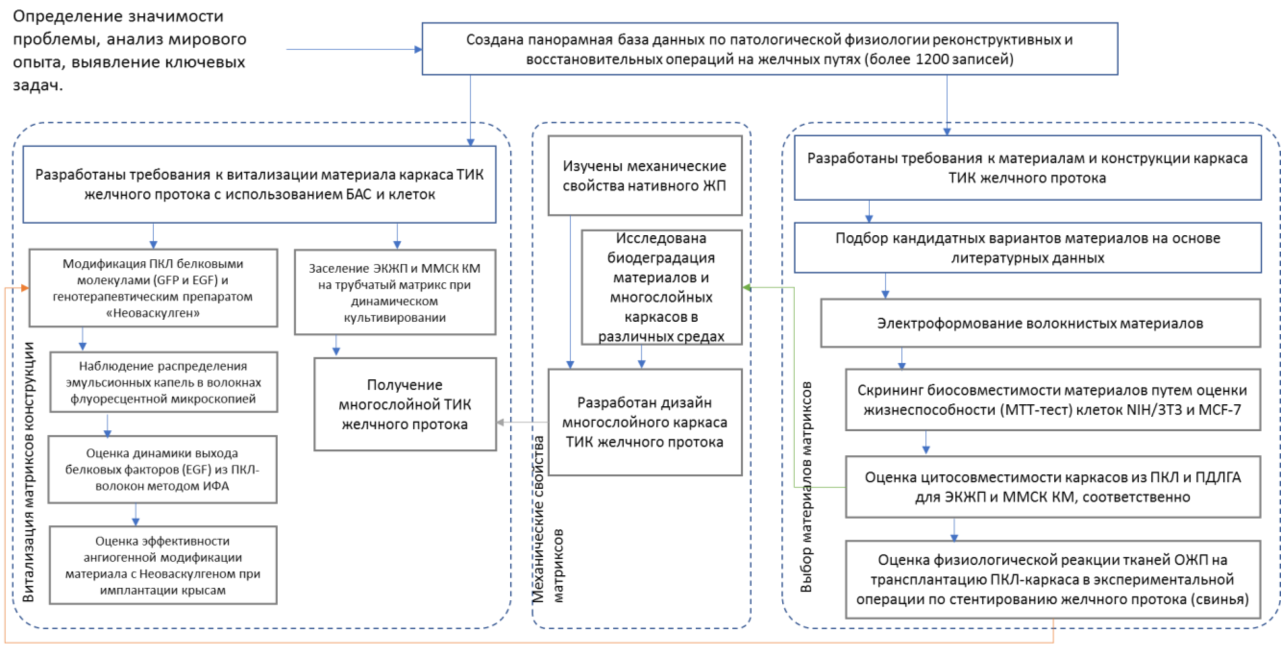


Рисунок 2.1 Структура работ по созданию многослойной ТИК желчного протока

2.2. Полимерные материалы, использованные для изготовления синтетических каркасов

При изготовлении плоских образцов пористых каркасов были использованы следующие 1) диацетат целлюлозы (ДАЦ), содержащий 39,7% ацетильных групп, 50 кДа, (Sigma Aldrich); 2) ПКЛ, 80 кДа, (Sigma Aldrich); 3) ПДЛГА (75:25), 76-115

кДа, (Sigma Aldrich); 4) ПДЛГА+ (70:30), (НБИКС-центр Курчатовского института), 104 кДа; 5) PLCL (70:30), (Corbion Purac).

При изготовлении трубчатых однослойных и многослойных композитных каркасов использовались ПКЛ, ПДЛГА, PLLGA, PLCL или ДАЦ, свойства которых по данным литературы приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 Сравнительные характеристики механических свойств и параметров деградации полимерных материалов

Материал	Прочность на растяжение, МПа	Модуль упругости, ГПа	Период биодеградации *in vitro*, мес.
ПКЛ	20–42	0,21–0,45	24–48
PLA	21–60	0,4–3,5	6–12
PLLA	60–70	2,7–4,1	>24
PDLA	27–50	1,0–3,5	12–16
PGA	60–110	6,0–7,0	6–12
PLCL	18–22	0,6	12–24
PLDGA	40–50	3,4–3,8	1–2
PLLGA	60–70	3,5–4,5	
ДАЦ	25–30	0,4–0,5	

2.3. Биологически активные соединения, использованные для модификации и визуализации структур волокнистых материалов

2.3.1. Зеленый флуоресцентный белок

Для визуализации волокон в конфокальной микроскопии использовали зеленый флуоресцентный белок (GFP) (Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Россия). Использование GFP позволяло выявить инкорпорирование белковых молекул в структуру полимерного волокна при использовании метода эмульсионного электроформования. При электроформовании для флуоресцентной маркировки волокон использовали соотношение между GFP и ПКЛ равное 160 нг/1 г.

2.3.2. Эпидермальный фактор роста

Для модификации материала каркаса был выбран эпидермальный фактор роста (EGF) (Invitrogen, США) – белок, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток, который входит в состав специальных питательных сред для культивирования эпителиальных клеток из различных источников [107].

При проведении цитометрии в реальном времени с помощью подсчета клеточного индекса использовали концентрацию EGF, рассчитанную следующим образом. По спецификации производителя концентрация EGF, необходимая для активации клеток, составляла ED50 = 250 пг/мл. Для 100% активации клеток в культуре была выбрана концентрация ED50 × 3 = 750 пг/мл.

При электроформовании для получения модифицированных волокон использовали соотношение между EGF и ПКЛ равное 5500 нг/1 г.

2.3.3. Генотерапевтический препарат “Неоваскулген”

Генотерапевтический препарат “Неоваскулген” (НВГ) представляет собой ДНК-плазмиду pl-VEGF165 (производитель – ПАО «Институт стволовых клеток человека», Россия, регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ЛП-000671 от 28.09.2011) в буферном растворе в концентрации 1 мг/мл. Важной особенностью таких препаратов является то, что ДНК-плазмиды не оказывают иммуногенный эффект [346].

При получении модифицированных каркасов из ПКЛ в процессе формования в материал были внедрены образцы НВГ в двух концентрациях (низкой – 0,005 мг/мл, и высокой – 0,05 мг/мл). В пересчете на массу волокнистого ПКЛ концентрация препарата составила $4{,}1\times10^{-4}$ грамм НВГ на 1 грамм ПКЛ (высокая концентрация, ВКп) и $0{,}41\times10^{-4}$ грамм (низкая концентрация, НКп), соответственно. В качестве контроля использовались конструкции из волокнистого материала без внедрения НВГ.

2.4. Метод электроформования для изготовления полимерных материалов каркаса

Простым и эффективным методом получения ТИК с разветвленной пористой структурой и диаметром волокон в субмикронном диапазоне является метод электроформования. Данный метод широко используется для решения задачи получения волокнистых материалов при создании трехмерных конструкций [289].

2.4.1. Метод электроформования нетканого материала каркаса

Образцы биосовместимых полимерных материалов и конструкций на их основе изготавливались методами электроформования в лаборатории полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт» (д.ф.-м.н. С.Н. Чвалун, к.х.н. Т.Х. Тенчурин) в соответствии с разработанными требованиями.

Типичная установка электроформования состоит из трех основных узлов: капилляра, через который поступает подлежащая распылению жидкость, высоковольтного источника напряжения и заземленного коллектора. Шприцевые насосы, гравитационные силы или сжатый газ используются для создания непрерывного потока распыляемого материала через сопло в камеру распыления. Электрод от источника высокого напряжения погружают в жидкость или подключают непосредственно к капилляру, если используется металлическая игла. Конструкция используемой в данной работе для изготовления волокнистых каркасов установки электроформования приведена на рисунке 2.2.

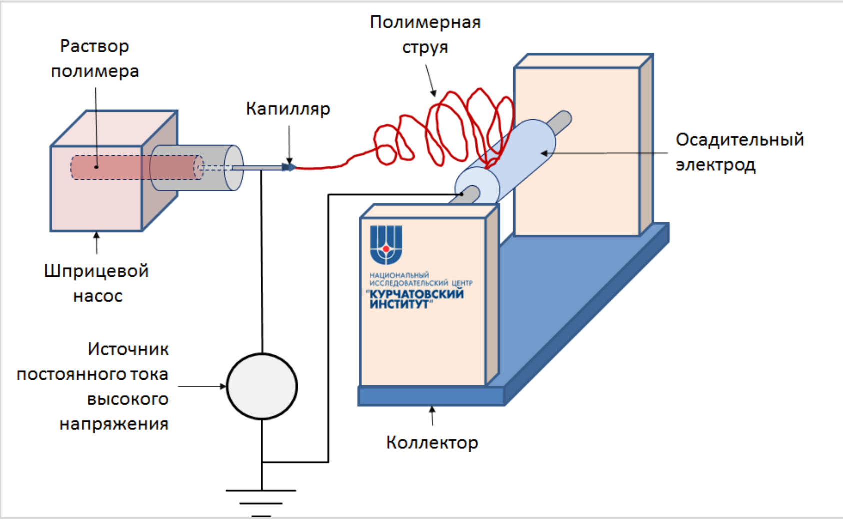


Рисунок 2.2 Схема установки электроформования полимерных волокон для создания каркасов ТИК в лаборатории полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт»

Для получения волокнистых каркасов были выбраны следующие значения параметров процесса электроформования: концентрация полимера с~20 г/л и выше, напряжение V~10-20 кВ, расстояние между иглой и коллектором L~15-25 см, скорость подачи полимера U~1-5 мл/ч.

2.4.2. Эмульсионное электроформование модифицированных полимерных материалов

В работе проводилась модификация каркасов из ПКЛ или ПДЛГА с использованием белков GFP, EGF, а также препарата НВГ. Для модификации каркасов белки или НВГ растворяли в фосфатном буфере (PBS), который далее совмещали с раствором волокнообразующего полимера в хлороформе путем приготовления эмульсию водного раствора в хлороформе. БАС вводились в волокнистый материал через эмульсию, полученную на магнитной мешалке без использования поверхностно активных веществ (ПАВ), однако при этом время жизни такого раствора оказывалось невелико. Плюроник F-127 (Pluronic F-127, Sigma-Aldrich, США) использовался в качестве ПАВ при электроформовании волокон с целью уменьшения межфазного натяжения и получения более устойчивой эмульсии.

2.4.3. Изготовление трубчатых каркасов методом электроформования

Изготовление многослойных образцов трубчатого каркаса проводили путем осаждения электроструи полимера на специальный трубчатый электрод и получения волокнистого или непроницаемого для желчи трубчатого каркаса регулируемой толщины. В дальнейшем получившийся трубчатый каркас либо использовался самостоятельно, либо служил основой для создания многослойных каркасов.

2.4.4. Изготовление непроницаемых для желчи трубчатых каркасов с использованием полимерной пленки

Получение непроницаемого для желчи слоя, который изготавливается при формовании невысохших волокон, представляется весьма перспективным, так как этот слой получается с помощью того же процесса электроформования, что и весь каркас, при этом исключается стадия изготовления и нанесения полимерной пленки. Для изготовления этого слоя использовался тот же полимерный раствор, что и для получения волокнистого слоя из ПКЛ. При отработке технологических приемов получения непроницаемого слоя была проведена серия экспериментов, которая позволила выбрать оптимальный режим. По этому режиму производительность процесса формования составляет 30 см^3/ч, а межэлектродное расстояние 6,5-7,0 см. Этот режим обеспечивает не только изготовление непроницаемого слоя, но и гарантирует нерасслаиваемость (целостность) образцов.

При изготовлении непроницаемых для желчи трубчатых каркасов использовалась пленка из ПКЛ толщиной 73±13 мкм, полученная по обычному способу из мало концентрированного раствора на основе хлороформа. Основной технологической задачей при использовании пленки являлось её закрепление на волокнистом слое из ПКЛ и крепление к её поверхности волокнистых слоев из PLDGA, PLLGA, PLCL или ДАЦ. Эта задача была решена при изготовлении образцов №1, № 2, № 3, в которых на пленку из ПКЛ наносились волокнистые слои из PLLGA, PLDGA и PLCL, соответственно. Для крепления пленки к волокнистому слою из ПКЛ в течение 1,5 минут на него наносился слой невысохших волокон,

который получался при производительности 30 $см^3/ч$, с расстояния 6-7 см. На этот слой устанавливалась пленка, которая хорошо приклеивалась к нему, перехлест пленки составлял ⅓ диаметра. После установки пленки, её край протирался смоченной в хлороформе марлей, что позволяло надежно его закрепить. После установки пленки на её поверхность в течение 1,5 минут наносился слой невысохших волокон ПКЛ, формуемых по вышеописанному режиму, что позволяло получать нерасслаивающиеся образцы. Толщина непроницаемого слоя из невысохших волокон не превышала 0,1 мм. Поверх этого слоя наносились волокнистые слои из различных полимеров: PLDGA, PLLGA, PLCL или ДАЦ. Процесс нанесения волокон из этих полимеров начинался при межэлектродном расстоянии 6-7 см, когда формуются невысохшие волокна, и постепенно увеличивался до 20 см.

2.4.5. Получение трехслойных композитных каркасов тканеинженерной конструкции

Трехслойные композитные каркасы получали из слоев ПКЛ, ПДЛГА, PLLGA, PLCL или ДАЦ, поскольку ранее данные полимеры показали отсутствие выраженной цитотоксичности, а разнообразие свойств материалов позволяло в дальнейшем проводить сравнения не только отдельных слоев, но и готовых композитных конструкций в целом.

Получение экспериментальных образцов трехслойных биосовместимых каркасов проводили в три стадии, в процессе которых получали волокнистые слои, располагающиеся друг над другом. Значения объемного расхода, межэлектродного расстояния, подаваемого напряжения, размера волокон и пористости и времени получения определялись в процессе работы. Режим электроформования подбирали таким образом, чтобы формировался срединный непроницаемый для желчи слой из ПКЛ.

Готовили 7% раствор ПКЛ в растворителе, состоящем из 90% хлороформа и 10% этанола. После полного растворения замеряли его характеристики: вязкость 0,29 Па·с, удельная электропроводность $2{,}1 \cdot 10^{-7}$ См/см.

Готовили 16% раствор PLCL в растворителе, состоящем из 90% этилацетата и 10% этанола, после полного растворения замеряли его характеристики: вязкость 0,54 Па·с, удельная электропроводность $3 \cdot 10^{-6}$ См/см.

В установку для электроформования устанавливали осадительный электрод диаметром 4,3 мм. Растворы полимеров помещали в одноразовые шприцы объемом 20 мл, которые устанавливают в шприцевые насосы. Шприцы соединяли с волокнообразующими элементами (капиллярами), которые были соединены с источником высокого напряжения.

Методом электроформования послойным нанесением из раствора ПКЛ и хлороформа вязкостью 0,29-1,28 Па·с, удельной электропроводностью от $2,1 \cdot 10^{-7}$ до $7,3 \cdot 10^{-5}$ См/см производили формование первого слоя толщиной 0,3 мм с производительностью от 0,88 от 15,2 $см^3$/ч на вращающийся осадительный электрод, при межэлектродном расстоянии от 12 до 30 см. На первый слой без остановки процесса в течение от 1,5 до 3,5 мин. производили формование второго слоя толщиной от 0,1 до 0,15 мм из полимерного раствора при межэлектродном расстоянии от 6,0 до 8,5 см и производительности от 26,4 до 41,6 $см^3$/ч. Сразу после завершения изготовления второго слоя поверх него производили формование третьего слоя толщиной от 0,2 до 0,4 мм при межэлектродном расстоянии от 12 до 30 см, производительности процесса от 4,0 до 12,0 $см^3$/ч при продолжающемся вращении осадительного электрода из раствора одного из биоразлагаемых полимеров.

По достижении толщины стенки трубчатого элемента 0,7–0,8 мм, шприцевой насос выключали, вращение осадительного электрода отключали. Осадительный электрод выдвигали из защитного короба и с помощью ножа разрезали на трубочки необходимой длины. Съем трубочек осуществляли в стерильных перчатках. Пример компоновки полученных таким способом образцов многослойных каркасов представлен на рисунке 2.3.

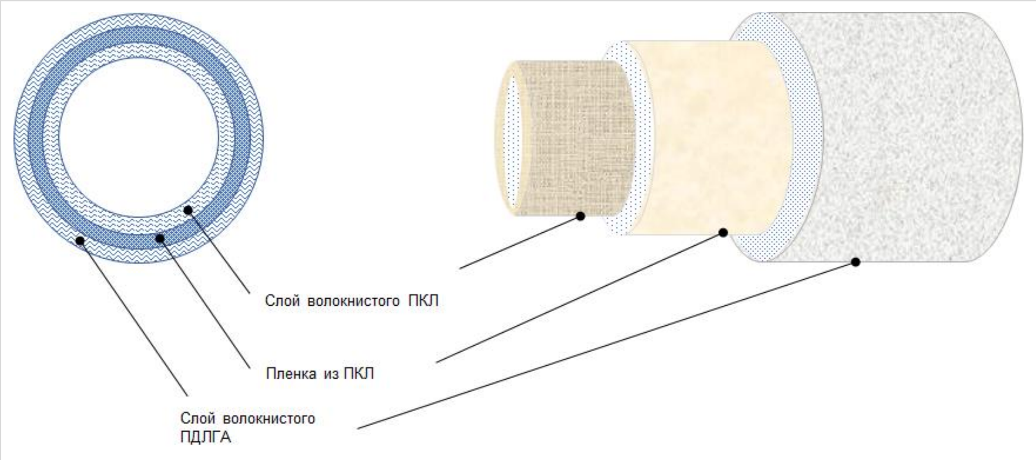


Рисунок 2.3 Схема многослойной структуры композитного каркаса ТИК желчного протока в составе слоя волокнистого ПКЛ, ПКЛ-пленки и слоя волокнистого ПДЛГА

Полученные образцы трехслойных композитных каркасов в дальнейшем использовались для изучения их физико-механических свойств, а также двухслойного заселения клеточными культурами.

2.5. Физико-механические методы оценки свойств нативных и искусственных материалов

2.5.1. Определение физических характеристик волокнистых каркасов

Структура изготовленных образцов была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (Helios 600i, FEI, США). Геометрические размеры волокон определяли из анализа полученных изображений с помощью программы Scope Photo (Hangzhou Scopetek, Китай).

Средний диаметр волокна рассчитывался по результатам измерения диаметра 70-100 волокон на основе полученных микрофотографий.

Определение площади поверхности образцов волокнистых материалов рассчитывали на основе полученных микрофотографий по формуле Ф.2.1:

$$S = \frac{4}{d} \times \frac{m_{обр}}{\rho_п} \quad (Ф.2.1)$$

где $S_{пов}$ – площадь поверхности образца волокнистого материала, м^2; d – средний диаметр волокна, м; $m_{обр}$ – масса образца, кг; $\rho_п$ – плотность волокнообразующего полимера, кг/м^3.

Определение пористости (Δ%) волокнистых образцов проводили на образцах размером 4 см × 4 см. Толщину материалов определяли с помощью толщиномера ТР-25-100Б (Россия). Вес образцов измерялся на аналитических весах Sartorius CPA324S-0CE (Sartorius, Германия) с точностью 0,1 мг. Расчет пористости образцов производили из отношения между объемом волокон $V_в$ и объемом всего материала $V_м$ в процентах.

$$Vв = \frac{m_м}{ρв} \qquad (Ф.2.2)$$

$$Vм = T×S \qquad (Ф.2.3)$$

$$Δ = \left(1 - \frac{V_в}{V_м}\right) × 100\% \qquad (Ф.2.4)$$

где $m_м$ – вес образца в граммах; $ρ_в$ – удельный вес полимера, из которого изготовлен материал, г/см^3; T – толщина образца, см; S–площадь поверхности образца, см^2.

Размер пор образцов определяли методом точки пузырька. Данным методом по уравнению Лапласа (Ф.2.5) можно рассчитать размер крупных (образование 1-го пузырька) пор в образцах.

$$D = \frac{4·γ·cosθ}{P} \qquad (Ф.2.5)$$

где γ – поверхностное натяжение на границе "этиловый спирт – воздух" 22,8 мН/м при 20°С; θ – краевой угол смачивания; Р – давление в точке пузырька, Па.

Определение краевых углов проводилось с помощью системы анализа формы капли KRUSS DSA 30E (Krüss GmbH, Германия). Поскольку степень смачиваемости материалов определялась по воде, полученные результаты позволяли также судить о гидрофильных свойствах получаемых волокнистых материалов.

2.5.2. Определение механических характеристик нативных тканей и синтетических каркасов

Механические характеристики нативного и децеллюляризованного желчного протока, а также синтетических каркасов измеряли на разрывной машине Instron-5965 (Instron Co., США) при скорости растяжения 10 мм/мин, и при температуре

23°C и относительной влажности 60%. Для проведения механических испытаний образцов желчного протока в аксиальном направлении использовали прямоугольные образцы с размером рабочей части 10 мм × 10 мм, а для синтетических образцов 10 мм × 5 мм. Для испытаний в радиальном направлении использовали кольцевые образцы шириной 5 мм. До момента испытаний все образцы нативного и децеллюляризованного желчного протока находились в среде PBS, все каркасы после изготовления вакуумировались при разрежении 1 мбар в течение 1 сут и в дальнейшем хранились в герметичных контейнерах. Время кондиционирования при 23°C составляло не менее 4 часов. Вид образца протока перед испытаниями представлен на рисунке 2.4. Удельные механические характеристики рассчитывали, используя измеренные линейные размеры. Толщину образца определяли как среднее арифметическое по трем точкам на расстоянии не менее 5 мм друг от друга.



Рисунок 2.4 Вид образца децеллюляризованного желчного протока перед испытаниями в различных режимах

Прочность каркасов определяли по формуле Ф.2.6, используя условное сечение, рассчитанное исходя из массы образцов и плотности полимера:

$$\delta = \frac{F_p}{S_{усл}} = \frac{l \cdot \rho \cdot Fp}{m} \qquad (Ф.2.6)$$

где $F_р$ – разрывная нагрузка, Н; l – длина рабочей части образца, м; m – масса рабочей части образца, кг; ρ – плотность полимера, кг/м^3.

Общий вид образцов синтетических каркасов во время испытаний представлен на рисунке 2.5.

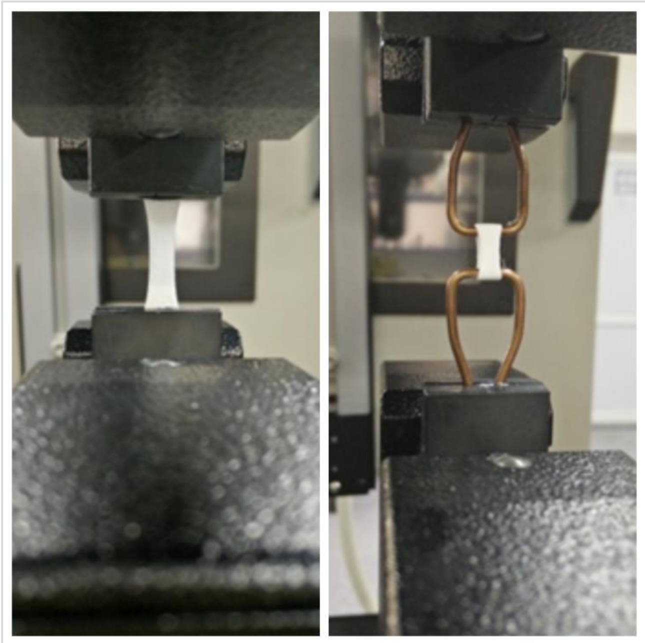


Рисунок 2.5 Образцы синтетических каркасов желчного протока во время испытаний в различных режимах

2.5.3. Изучение проницаемости материалов для водных растворов

Биосовместимый материал для создания каркаса ТИК должен быть проницаем для водных растворов. Электроформование позволяет получать пористые материалы, способные обеспечить эффективный транспорт питательных веществ и сигнальных молекул к клеткам, растущим на пленке или в объеме композитного каркаса. Проницаемость материала для водных растворов проверяли по следующему протоколу: на первом этапе эксперимента с пленки снимали статический заряд путем погружения ее в буферный раствор. Затем пленку высушивали и гидрофилизовали путем обработки в плазме. После пленку укладывали на фильтровальную бумагу, наносили сверху каплю раствора чернил и проверяли проникновение чернил через пленку по оставленному видимому следу на фильтровальной бумаге.

2.5.4. Изучение непроницаемости пленок в составе композитных каркасов

Контроль непроницаемости пленки в составе электроформованных трубчатых каркасов проводился с использованием этилового спирта и дистиллированной воды. Для этого трубчатый каркас с одного конца зажимался в винтовой зажим, устанавливался вертикально, затем смачивался этиловым спиртом и заполнялся дистиллированной водой. Если в течение 10 минут уровень воды не изменялся, каркас считался непроницаемым.

2.5.5. Исследование биодеградации материалов каркаса в различных средах

Испытание кинетики деградации плоских и трубчатых образцов биосовместимого каркаса осуществляли в различных средах: дистиллированной воде (H_2O), PBS, реактиве Фентона (H_2O_2 с солями двухвалентного железа), питательной культуральной среде с 10% FBS (DMEM+10%FBS) и без нее (DMEM), а также медицинской желчи. Выбор подобных сред был обусловлен репертуаром различных физических условий для гидролиза полимерных соединений, в которых будет находиться каркас после имплантации.

Степень биодеградации экспериментальных образцов биосовместимого каркаса оценивалась по следующим показателям: изменение веса образцов, механическая прочность и молекулярная масса. Вес и механическая прочность образцов определялись для всех разработанных видов каркасов, а изменение молекулярной массы, веса и механической прочности проводилось только для плоских образцов. Такое разделение объясняется тем, что каркасы изготовлены с использованием двух полимеров, и сложно определить, за счет какого именно полимера происходит изменение молекулярной массы. Исследование кинетики деградации проводилось в вышеперечисленных средах при температуре 37^{o}C, временной шаг на первом этапе составлял 14 суток. По результатам испытаний определяли время дальнейшего нахождения образцов в указанных средах.

Каждый образец после извлечения из среды помещали в дистиллированную воду для удаления низкомолекулярных веществ. С этой целью образцы погружали в коническую колбу объемом 200 мл, содержащую 100 мл воды, после чего ее помещали на лабораторный шейкер ПЭ-6410 (НПО “Экрос”, Россия) в течение 1 ч. Подобную операцию проводили три раза, затем образцы доводили до постоянного веса в вакуумном шкафу. Для определения степени потери массы проводили взвешивание образцов до и после эксперимента.

Молекулярно-массовые характеристики образцов или их частей, оставшихся после деградации, определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на хроматографической системе «Knauer» с использованием рефрактометрического детектора и колонки Phenomenex (США) размерами 300 мм × 7,8 мм, с сорбентом Phenogel с размером пор 10^4 Å. Колонки калибровали по полистирольным стандартам. Исследования проводили при 40°C и скорости потока элюента 1 мл/мин. Для исследования готовили раствор образца полимера в тетрагидрофуране с концентрацией 2-5 мг/мл. Перед введением в хроматограф раствор фильтровали через шприцевой фильтр с гидрофобной политетрафторэтиленовой мембраной с размером пор 0,45 мкм.

2.5.6. Исследование хирургической прошиваемости волокнистого материала каркасов

Хирургическую прошиваемость материала определяли качественно *in vitro* и *in vivo*. Данная характеристика является одной из ключевых, так как исследуемый материал в дальнейшем будет использован для изготовления каркаса ТИК хирургического назначения.

Прошиваемость *in vitro* проверяли с использованием хирургических нитей 6-0 PROLENE (Ethicon). Материал считали прошиваемым, если на нем можно сделать петлю из хирургической нити и затянуть ее без разрыва и расширения отверстия, оставленного иглой.

Прошиваемость *in vivo* проверяли при выполнении экспериментальных операций по подшиванию волокнистого материала в лопаточную область крысам,

а также имплантации трубчатой конструкции в желчный проток свинье. Изучалась возможность наложения швов и механическая состоятельность анастомоза. Решение о прошиваемости материала принималось тремя участвующими в операции хирургами по результатам интраоперационного наблюдения.

2.6. Получение и культивирование клеток, высеваемых на волокнистые каркасы

В настоящей работе для витализации каркаса ТИК применялись тканевое культивирование ЭКЖП с использованием биоматериала здорового донора и культура ММСК КМ, выделенная из КМ здорового донора. Оценку цитотоксичности исследуемых материалов проводили на клеточных линиях MCF-7 и NIH/3T3.

2.6.1. Получение и культивирование ММСК КМ

ММСК КМ получали от здорового донора по протоколу, одобренному Локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Для получения культуры ММСК КМ забирали костный мозг человека путем пункции гребня подвздошной кости (после получения информированного согласия) в условиях процедурного кабинета под местной анестезией. Аспират КМ помещали в стерильный контейнер (мешок, шприцы), в котором содержится специальная среда для забора (0,5 мл PBS, содержащего 50 ЕД/мл гепарина для предотвращения свертывания, и 0,25 мг/л гентамицина), и доставляли в лабораторию при температуре 20-24°С.

Работа с клеточными культурами ММСК КМ проводилась в соответствии с общими принципами осуществления культуральных исследований в Центре коллективного пользования «Регенеративная медицина» Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (ID310020). Все манипуляции с клетками проводили в чистой зоне класса А (5 класс по ISO) уникальной научной установки «Технологический комплекс чистых помещений для производства клеточных продуктов» в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Полученный аспират КМ помещали в центрифужные пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при 1500 об/мин (350g) 5 минут. Осадок клеток ресуспендировали в растворе для лизиса эритроцитов (114 мМ NH_4Cl, 7,5 мМ $KHCO_3$, 100 мкМ EDTA) в течение 3-5 мин и повторно центрифугировали в том же режиме. Гемолизированный супернатант удаляли отсасыванием, а клеточный осадок, свободный от эритроцитарных и тромбоцитарных элементов, ресуспендировали в полной питательной среде α-MEM (Invitrogen, США), содержащей 10% FBS (HyClone, США), 0,4 мкМ инсулин, 20 нг/мл bFGF, 10 нМ дексаметазона и 1% пенициллина/стрептомицина. Выделенные клетки представляли собой первичную культуру преимущественно мононуклеарных клеток КМ, которые затем высевали в концентрации 2,0-2,5×10^6 клеток/$см^2$ в культуральных флаконах площадью 175 $см^2$ (Corning, США). Затем культуральные флаконы помещали в CO_2-инкубатор с концентрацией CO_2 5%, атмосферного воздуха 95% и с повышенной влажностью.

Через 48 часов после выделения первичной культуры не прикрепившуюся клеточную взвесь удаляли, а оставшиеся клетки продолжали культивировать в среде того же состава. Замену культуральной среды на свежую осуществляли каждые 72 часа. После образования субконфлюэнтного монослоя клетки однократно отмывали раствором DPBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, затем снимали с помощью раствора 0,25% трипсин/ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, США), центрифугировали при 350g в течение 5 минут, убирали надосадок, осадок ресуспендировали в полной питательной среде и помещали на новую культуральную поверхность в концентрации 30% от монослоя. Таким способом получали клетки до 5-го пассажа включительно и засевали ими культуральный пластик. Оставшиеся клетки замораживали в стандартных условиях с использованием среды для заморозки, содержащей 90% FBS HyClone def (HyClone Inc., США) и 10% DMSO Hybrimax (Life Technologies, США), и помещали в криохранилище ЦКП «Регенеративная медицина» Первого МГМУ им. И.М. Сеченова для дальнейших исследований.

2.6.2. Получение и культивирование ЭКЖП

Образец желчного протока для исследования его механических свойств получали от трупного донора в соответствии с протоколом, одобренным Локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Фрагмент желчного протока для использования в целях заселения биосовместимых каркасов методом тканевого культивирования был получен от здорового донора после получения информированного согласия во время операции гастропанкреатодуоденальной резекции. Фрагмент был разрезан вдоль и помещен в контейнер с транспортной средой, состоящей из DMEM/F12 с 3% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США). Вне организма, в стерильных условиях, часть фрагмента поместили в полную питательную среду KSFM (Gibco, США) на дно чашки Петри эпителиальной стороной вверх.

Пробоподготовку другой части фрагмента желчного протока проводили следующим образом. Готовили 1% раствор диспазы II-го типа (Sigma, США) в 5 мл среды KSFM (Life Technologies, США). После стерилизации раствора диспазы путем фильтрации через фильтр с порами 0,22 мкм фрагмент желчного протока помещали в центрифужную пробирку со стерильным раствором фермента и устанавливали в роллер на медленное вращение (3 об/мин) при 37°C (CO_2 инкубатор или термостат) на 1 час. После обработки диспазой, фрагмент в ламинарном шкафу двукратно промывали KSFM в чашке Петри. Далее с помощью микропинцета и одноразового скальпеля с внутренней стороны желчного протока отделяли слой ЭКЖП в виде пленки или отдельных полосок. Затем слой ЭКЖП переносили в новую чашку Петри и с помощью скальпеля измельчали без раздавливающих движений и добавляли KSFM.

Готовили полную бессывороточную питательную среду для ЭКЖП в соответствии с инструкцией к KSFM. Суспензию эпителиальных фрагментов осаждали при 1000 оборотов/мин (250g) в течение 5 минут, осадок ресуспендировали в полной питательной среде и помещали на культуральную

поверхность. Через 48 часов после посева первичной культуры не прикрепившуюся клеточную взвесь удаляли.

Культивирование ЭКЖП осуществляли в стандартных условиях в CO_2-инкубаторе с концентрацией CO_2 5%, атмосферного воздуха 95% и с повышенной влажностью. Замену культуральной среды на свежую осуществляли каждые 48-72 часа. Пассирование клеток проводили следующим образом: после образования субконфлюэнтного монослоя (70% площади культурального пластика) клетки однократно промывали раствором DPBS (Life Technologies, США), затем снимали с помощью раствора Версена с 0,05% трипсином, центрифугировали при 350g в течение 5 минут, убирали надосадок, осадок клеток ресуспендировали в полной питательной среде и высеивали в новую культуральную посуду, в том числе на чашки Петри и флаконы, покрытые смесью белков 100 мкг/мл коллагена, 20 мкг/мл фибронектина и 2 мкг/мл ламинина.

2.6.3. Культивирование клеток линии NIH/3T3

Культивирование иммортализованных клеток линии NIH/3T3 (эмбриональные фибробласты мыши) проводили в полной питательной среде, содержащей DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 1% пенициллина/стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США).

2.6.4. Культивирование клеток линии MCF-7

Культивирование опухолевых клеток линии MCF-7 (эпителиоподобная аденокарцинома протоков молочной железы человека) проводили в полной питательной среде, состоящей из DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 1% пенициллина/стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США).

2.7. Заселение волокнистых каркасов ЭКЖП и ММСК КМ

Заселение каркасов ТИК клетками проводили двухэтапно с использованием методов тканевого культивирования и культивирования при вращении. Общая схема заселения каркасов представлена на рисунке 2.6.



Рисунок 2.6 Схема заселения каркасов ЭКЖП и ММСК КМ для получения ТИК желчного протока

2.7.1. Заселение внутренней поверхности каркасов эпителиальными клетками методом тканевого культивирования

Общей особенностью существующих методов заселения каркасов клеточными культурами является наличие стадии культивирования клеток *in vitro*. Инкубирование *in vitro* некоторых специализированных клеток, в частности ЭКЖП, зачастую приводит к уменьшению пролиферативной активности, и тем самым ограничивая последующую экспансию клеток в составе ТИК. Данная проблема может быть решена за счет использования метода тканевого культивирования, в котором используется физическое соединение нативной биологической ткани с биосовместимым материалом вне организма, причем в настоящей работе в качестве нативной ткани использовался желчный проток. При использовании данного метода предполагается миграция клеток на поверхность и заселение биосовместимого материала.

Для заселения внутренней поверхности каркаса ЭКЖП, фрагмент желчного протока физически соединялся с поверхностью каркаса в присутствии полной питательной среды KSFM. На 4-е сутки ЭКЖП мигрировали из фрагментов ткани

желчного протока и заполнили поверхность каркаса. Пример использования метода тканевого культивирования на образце плоской коллагеновой мембраны приведен на рисунке 2.7.

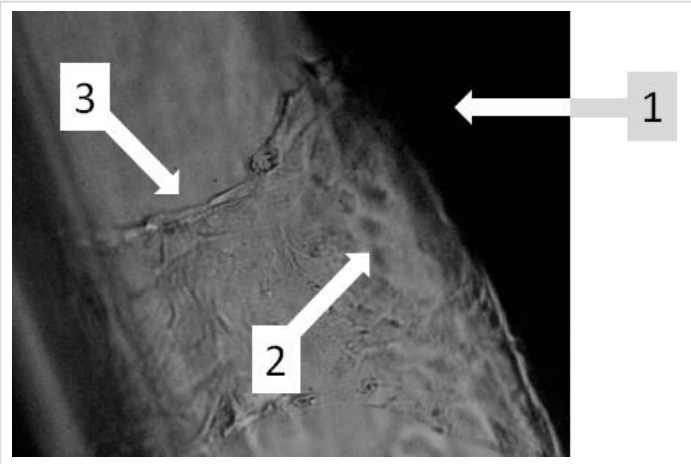


Рисунок 2.7 Заселение каркаса методом тканевого культивирования: 1 – ТИК, 2 – фрагмент желчного протока, 3 – коллагеновая мембрана. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение ×200

Использование данного способа заселения способно улучшить эффективность витализации материала каркаса за счет выхода клеток из ткани-источника клеток непосредственно на биосовместимый материал, увеличить популяцию выделенных клеток и устранить риск повреждения клеток при их ферментативном снятии с культуральной поверхности, что позволяет сократить общие сроки получения ТИК. Использование эффекта спонтанной клеточной миграции в качестве промежуточной стадии заселения должно привести к заселению каркаса клетками с наибольшей жизнеспособностью, а следовательно, и наибольшей пролиферативной активностью [137].

Заселение внутренней поверхности трубчатого каркаса ЭКЖП человека методом тканевого культивирования осуществляли путем внесения предварительно подготовленного фрагмента желчного протока внутрь каркаса, как показано на рисунке 2.8. Фрагмент крепился таким образом, что полностью покрывал внутреннюю поверхность каркаса, плотно прилегая к стенке.

Культивирование проводилось в полной питательной среде KSFM в течение 96-264 часов со скоростью тока среды 1,5 мл/час.

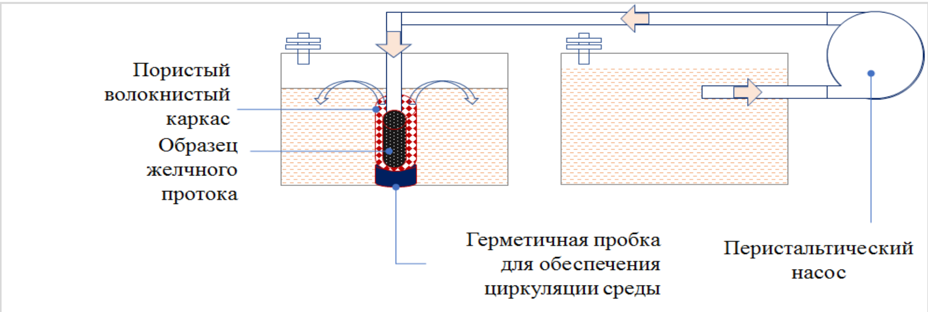


Рисунок 2.8 Схема заселения внутренней поверхности каркаса ЭКЖП человека методом тканевого культивирования

2.7.2. Заселение внешней поверхности каркасов мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга

Заселение наружной поверхности трубчатого каркаса осуществлялось с использованием ММСК КМ после заселения ЭКЖП внутренней поверхности трубчатого каркаса (Рис. 2.9). Засев каркаса ММСК КМ проводили при вращении 3-4 об/мин в течение 12-24 часов в концентрации 20-40×10^3 клеток/$см^2$. Среда культивирования α-MEM (Invitrogen, США) с 10% сыворотки HyClone Def (HyClone, США), 0,4 мкМ инсулин, 20 нг/мл bFGF, 10 нМ дексаметазона и 0,25 мг/л гентамицина.

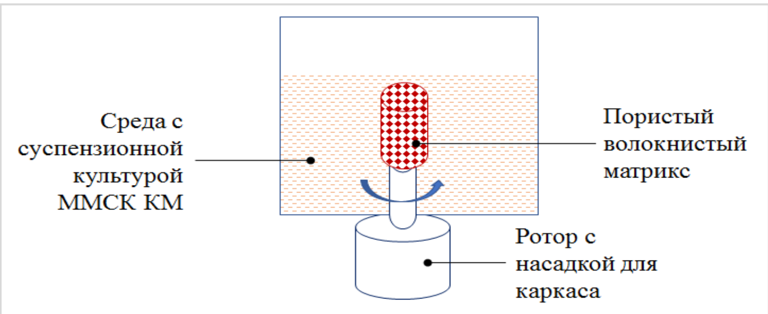


Рисунок 2.9 Схема заселения внешней поверхности каркаса ММСК КМ

2.8. Морфологические и аналитические методы исследования

2.8.1. Световая микроскопия

Микроскопию образцов с фазовым контрастом проводили на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TE-2000U (Nikon, США) с камерой DS-1 (Nikon, США).

2.8.2. Конфокальная микроскопия

Для определения эффективности заселения полимерных каркасов холангиоцитами проводили конфокальную микроскопию. Каркасы из ПКЛ с заселенными клетками эпителия желчного протока отмывали в PBS, затем фиксировали в 4% забуференном PBS растворе параформальдегида в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем трижды отмывали PBS и окрашивали ядерным флуоресцентным красителем NucBlue в концентрации 0,5 мкг/мл. Визуализацию проводили на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 710 с объективом Plan-Apochromat 20x/0.8 M27.

Оценку жизнеспособности ММСК КМ, заселенных на коллагеновые мембраны и волокнистые материалы, проводили методом конфокальной микроскопии с окраской клеток Live/Dead (Invitrogen, США) по протоколу производителя.

2.8.3. Флуоресцентная микроскопия

Для флуоресцентный микроскопии образцы фиксировали в 10% забуференном формалине, отмывали в PBS и пермеабилизировали метанолом с последующей отмывкой. Гистологические препараты предварительно депарафинизировали и проводили демаскировку антигена в ЭДТА в течение 10 минут при 90°С, после чего препараты отмывали. Окраску препаратов и клеток проводили посредством добавления к образцам 2% раствор BSA в PBS на 30 минут при комнатной температуре, отбирали жидкость и добавляли первичные антитела против исследуемых антигенов в 2% растворе BSA в PBS и 0,05% Tween-20 в концентрации 1 мкг/мл, и инкубировали в ночь при +4 °С. После промывали и

инкубировали со вторичными антителами, меченными флуоресцентными метками FITC или PE в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. Образцы отмывали, ядра визуализировали окраской бромистым этидием. Флуоресцентную микроскопию проводили на микроскопе Nikon Eclipse TE-2000U (Nikon, США) с камерой DS-1 (Nikon, США).

2.8.4. Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию поверхности нетканых волокнистых материалов изучали с помощью сканирующего электронно-ионного микроскопа Versa 3D DualBeam (FEI, США) в режиме высокого вакуума с использованием ICE-детектора вторичных электронов. Для определения среднего диаметра волокна измеряли не менее 100 волокон с помощью программы Scope Photo Image Software (ScopeTek, Китай).

2.8.5. Гистологические и гистохимические методы исследования

Для морфометрического и светооптического исследований патогистологические препараты фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине, заключали в парафин и делали срезы (4 мкм) на микротоме. Срезы помещали на непокрытые предметные стекла и депарафинизировали. Окрашивали гематоксилином Майера и эозином, или по методу Маллори по стандартной методике. Полученные препараты дегидратировали, просветляли и заключали под покровное стекло в синтетической монтирующей среде Shandon-Mount (Thermo Fisher Scientific, США). Гистологические препараты изучались при помощи универсального микроскопа Leica DM4000 B LED, оборудованного цифровой видеокамерой Leica DFC7000T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария). Оцифрованные изображения срезов высокого разрешения получали с помощью Pannoramic DESK (3DHISTECH Ltd., Венгрия). Морфометрическое определение плотности сосудов проводили в 10 случайных полях зрения (d=600 мкм) в программе Pannoramic Viewer (v. 1.15.4). Подсчет сосудов осуществляли три исследователя рандомизированным слепым методом.

Биорезорбцию эксплантированных образцов материала оценивали косвенно, поскольку волокнистый материал был растворен при пробоподготовке. Степень резорбции подсчитывали как отношение площади материала (белые области, в которых отсутствовала окрашенная ткань) к общей площади поля зрения. Параметры определяли при увеличении ×10 в программе Pannoramic Viewer (3DHISTECH, Венгрия).

2.8.6. Иммуноферментный анализ выхода EGF

Иммуноферментный анализ выхода EGF производили следующим образом. Образцы каркасов массой от 1 до 1,7 мг помещали в лунки планшета с 1 мл среды DMEM, содержащей 0,1% бычьего сывороточного альбумина, инкубировали от 2 до 77 сут, после чего отбирали 1 мл раствора и оценивали выход EGF из каркаса иммуноферментным «сэндвич» методом с использованием моноклональных антител к EGF (клон С6, ВНЦМДЛ, Россия). Поглощение измеряли при 450 нм на спектрофотометре Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, США). Инструментальная погрешность измерений составляла 0,001 единицы поглощения в соответствии с паспортом.

Пробы эмульсий, в объеме 0,5 мл, взятые при изготовлении эмульсии для оценки содержания EGF в активной форме, высушивались под вакуумом, а остаток растворялся в 1 мл питательной среды DMEM. Изучение состава этих эмульсий было необходимо для подтверждения наличия функциональных БАС на различных стадиях предподготовки эмульсии.

2.8.7. Скрининг материалов на клеточных линиях MCF-7 и NIH/3T3 с применением МТТ-теста

Исследование цитосовместимости образцов волокнистых материалов проводили на основе колориметрической оценки метаболической активности клеток по интенсивности реакции восстановления тетразолиевого красителя НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазными ферментами (МТТ-тест) при

использовании стандартных клеточных линий MCF-7 и NIH/3T3 в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-5-2011.

Скрининг волокнистых материалов проводили при помощи стандартного МТТ-теста на 7-е сутки культивирования. Заселение материалов проводили методами статичного и динамического культивирования. Клетки засевали в концентрации 14×10^3 кл/см^2 для NIH/3T3, 24×10^3 кл/см^2 для MCF-7 на образцы материалов стандартизированной по размеру и форме (круг площадью 0,33 см^2). Статичное культивирование проводили в 96-луночном планшете с объемом питательной среды 200 мкл/лунка. Динамическое культивирование проводили в криопробирках объемом 2 мл с неадгезионной поверхностью по 3 образца материала на пробирку с объемом питательной среды 600 мкл/криопробирка и при вращении 2 оборота/мин. Вращение осуществляли с помощью программируемого ротатора RM-1 (Elmi), помещенного в CO_2-инкубатор со следующими параметрами: тип вращения – равномерный; направление относительно оси симметрии – вдоль оси симметрии пробирки; скорость вращения – 3 оборота/мин. В качестве отрицательного контроля цитотоксичности применяли клетки в лунке и криопробирке без каркасов.

Для точной оценки количества клеток, прикрепившихся к поверхности образцов, кусочки каркасов из каждой лунки и криопробирки аккуратно переносили в свежую лунку нового 96-луночного культурального планшета и новую криопробирку, и доводили объём культуральной среды до 200 мкл/лунка и до 600 мкл/криопробирка. Затем добавляли раствор МТТ-реагента (1 мг/мл) в объеме 50 мкл/лунка и 150 мкл/криопробирка. Для учета фонового значения МТТ-реагента, раствор добавляли в лунки с питательной средой без клеток. Инкубирование проводили в течение 4 ч при 37°С, в процессе чего на дно лунок и материал образцов выпадали фиолетовые нерастворимые в воде кристаллы формазана. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли отсасыванием, вносили 200 мкл DMSO (Sigma) для растворения кристаллов в лунки или 600 мкл в криопробирки и получали окрашенный раствор, который переносили в 96-луночный планшет по 100 мкл/лунка от каждой пробы. Поглощение измеряли на

спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия) при длине волны 540 нм.

Выбор каркасов, подходящих для заселения методами статичного и динамического культивирования фибробластами и эпителиальными клетками, осуществляли сравнением оптической плотности исследуемых образцов материалов со средним значением оптической плотности внутри одной группы клеток, культивируемых определенным методом. Подходящим для использования в ТИК считался материал, параметры которого соответствовали следующей формуле: $A540_{\text{материала}} \geq A540_{\text{среднее значение}}$.

2.8.8. Цитометрия в реальном времени с подсчетом клеточного индекса

Созданные в соответствии с лабораторным технологическим регламентом образцы ТИК желчного протока исследовались с помощью системы для клеточного анализа в режиме реального времени (RTCA) на приборе iCELLigence (ACEA Biosciences, США). Поверхность ячейки планшета анализатора покрыта на 70-80% микроэлектродами, на которые подается электрический потенциал (22 мВ), не влияющий на состояние и поведение клеток. В режиме реального времени измерялся клеточный индекс (КИ) по формуле Ф.2.7.

$$\text{КИ} = \frac{(\text{импеданс в определенный момент времени } n) - (\text{импеданс в отсутствие клеток})}{(\text{номинальное значение импеданса})} \qquad (\text{Ф.2.7})$$

Значения импеданса зависят от количества адгезированных клеток, их размера и формы, а также от силы адгезии к субстрату [364]. Принципы клеточного анализа на основе измерения импеданса представлены на рисунке 2.10.

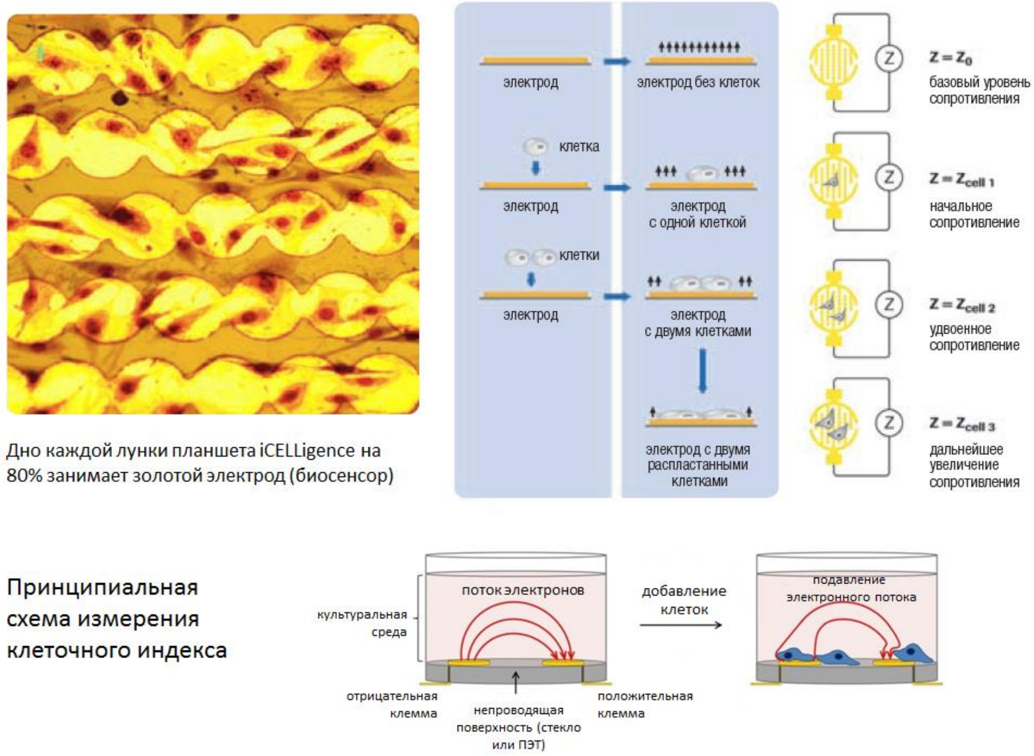


Рисунок 2.10 Принципиальная схема цитометрии в режиме реального времени на основе измерения электрического импеданса

Клеточную линию MCF-7 высевали в лунки специального E-планшета с площадью поверхности 0,64 см^2 с плотностью 60×10^3 клеток/см^2. Через 16 часов после посева клетки формировали монослой. Плоские образцы материалов стандартизировали по размеру и форме (круг площадью 0,33 см^2) и помещали сверху на сформированный монослой культуры клеток в экспоненциальной фазе роста.

При изготовлении модифицированных волокон были получены образцы, содержащие 5,5 нг EGF на 1 мг ПКЛ, что позволяло достигнуть 10-кратного запаса EGF для активации клеток в культуре и продолжительного выхода фактора роста в инкубационную среду.

При оценке биологического эффекта модифицированных EGF каркасов в качестве положительного контроля использовали среду, содержащую 50% эффективную дозу EGF (ED50), а в качестве отрицательного контроля применяли удаление сыворотки (serum deprivation) в полной питательной среде. Для контроля значений базового уровня клеточного индекса применяли одинаковый для всего

эксперимента объем полной питательной среды – 600 мкл. Значения клеточного индекса фиксировали в течение 87 часов.

2.9. Лабораторные животные

2.9.1. Мелкие лабораторные животные (крысы)

Основные экспериментальные работы выполнены на 30-ти линейных крысах-самках Вистар исходной массой тела 180-200 г в возрасте 2-х месяцев, выращенных в питомнике Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России (пос. Светлые Горы, МО) и содержавшихся в Центральном виварии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России при свободном доступе к пище и воде, и естественной смене светового режима.

Животных вводили в наркоз путем инъекции комбинации препаратов “Рометар” (Bioveta, Чехия) в объеме 0,02 мл и “Золетил-100” (Virbac, Франция) в объеме 0,02 мл внутримышечно. Во время операции животные не получали иного наркоза.

Модифицированные с использованием препарата НВГ образцы волокнистого ПКЛ с высокой концентрацией препарата (ВКп, образцы содержали $4{,}1\times10^{-4}$ грамм НВГ на 1 грамм ПКЛ), низкой концентрацией препарата (НКп, $0{,}41\times10^{-4}$ грамм НВГ на 1 грамм ПКЛ), а также контроля (волокнистый ПКЛ без модификации НВГ), размерами 1 см × 1 см, зашивались крысам в лопаточную область по 2 образца на животное, как показано на рисунке 2.11.

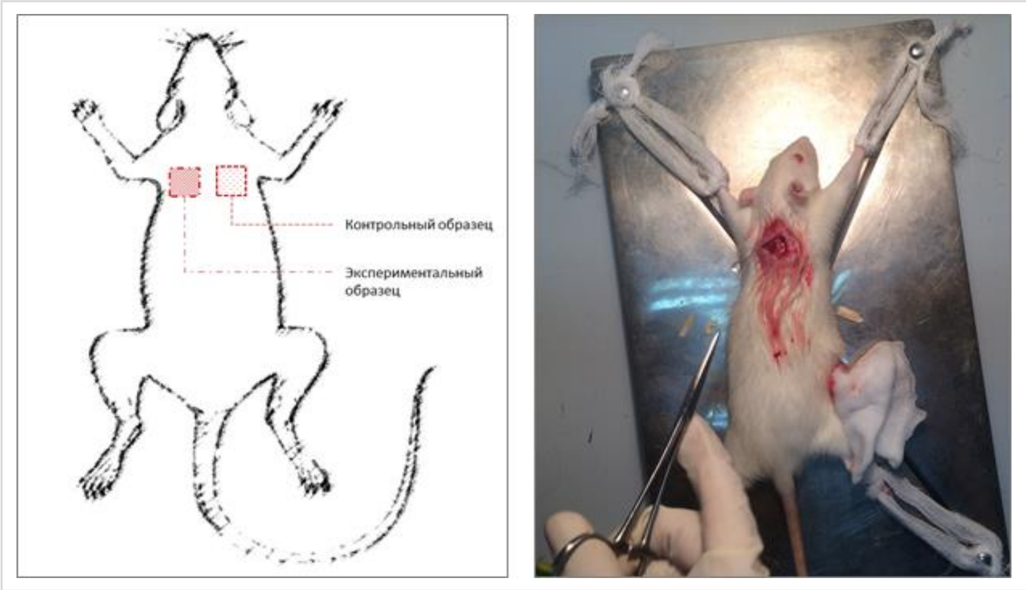


Рисунок 2.11 Схема хирургической операции по подшиванию материала в подлопаточную область на крысах

Использовались комбинации материалов “ВКп+контроль” и “НКп+контроль”. Диаметр волокон в имплантированных материалах составлял 2-5 мкм. Образцы крепились к лопаточной мышце рассасывающимся шовным материалом 7-0. После имплантации разрез на спине ушивался наглухо и экспонировался в течение 7, 16, 33, 46 и 64 суток.

Животных содержали в условиях Центрального вивария Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России при свободном доступе к пище и воде. Крыс выводили из эксперимента под этаминаловым наркозом (40 мг на 1 кг массы тела животного) путем декапитации. Материал выделяли вместе с прилежащими участками соединительной ткани.

Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г.), и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России №708 от 23.08.2010 г.

2.9.2. Крупное лабораторное животное (свинья)

Проведены экспериментальные исследования по имплантации конструкции из волокнистого ПКЛ в слизистую пересеченного желчного протока свиньи массой 70 кг.

Проведение экспериментальной операции проводили на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в соответствии с опубликованными рекомендациями по организации проведения хирургического эксперимента [9, 25]. Проводилась первичная подготовка операционного поля, в том числе сбривание щетины в зоне хирургического вмешательства и обработка кожи моющими средствами и антисептическими растворами. Животное вводили в состояние медикаментозного сна путем внутривенного введения «Золетил-100» (Virbac, Франция) в дозировке 5 мг/кг на 5% растворе глюкозы и поддерживающего внутримышечно «Рометар» (Bioveta, Чехия) 1 мл на 10 кг веса.

В операционной животное укладывали на операционный стол на спину и фиксировали за конечности ремнями. После введения в состояние медикаментозного сна и достижения обездвиживания, проводили катетеризацию вены на ухе для обеспечения болюсного внутривенного введения пропофола поддержания состояния сна, а также его введения по необходимости в случае появления признаков пробуждения. Анестезиологическая группа на время проведения операции налаживала полноценный мониторинг состояния животного: проводили трахеостомию с введением интубационной трубки и перевод животного на искусственную вентиляцию легких, а также катетеризацию бедренной артерии для мониторинга артериального давления.

Во время срединной лапаротомии выполняли скелетизацию гепатодуоденальной связки, мобилизацию общего желчного протока, проводили экспериментальное моделирование нециркулярного дефекта на ½ окружности и проводили стентирование протока трубчатым каркасом из ПКЛ длиной 30 мм и диаметром 5 мм.

В послеоперационном периоде содержание проводили в условиях нормального доступа к воде и пище. Спустя 1 месяц экспозиции животное выводили из эксперимента методом воздушной эмболии с предварительной внутривенной инъекцией «Золетил-100» в дозировке 5 мг/кг. Иссекали фрагмент общего желчного протока с имплантированным каркасом из волокнистого ПКЛ и проводили гистоморфологическое исследование образца.

Содержание животного и манипуляции с ним проводили в соответствии с правилами, одобренными Локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г.).

2.10. Методы статистической обработки

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Выборки проверяли на нормальное распределение по критерию Шапиро-Уилка, после чего оценивали влияние препарата на количество сосудов методом однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с апостериорным анализом Тьюки. Различия считали значимыми при $p<0,05$. Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение или среднее значение±стандартная ошибка среднего.

Заключение по Главе 2

Предлагаемые к использованию в настоящей работе материалы и методы соответствуют современному уровню тканевой инженерии. При изготовлении биосовместимых каркасов выбирались современные биосовместимые и биодеградируемые материалы. Волокнистые каркасы различного состава получали с помощью современного метода электроформования нетканого волокнистого материала, подходящего для заселения клетками. Использованы современные

методы модификации материала БАС и витализации каркаса клеточными культурами. Методы оценки физико-механических и биологических свойств изготовленных каркасов соответствуют поставленным в работе задачам. Скрининг биологической совместимости образцов материалов без модификации проводили, используя стандартный МТТ-тест. Оценку эффективности модификации материалов проводили методом ИФА, а биологический эффект образцов материалов оценивали подсчетом клеточного индекса в реальном времени. Оценку физиологической совместимости и физиологического эффекта материалов проводили при имплантации материала лабораторным животным с оценкой тканевой реакции и подсчетом плотности распределения сосудов. Объемы выборок являлись достаточными для получения достоверных научных результатов. Использованная в работе комбинация материалов и методов ранее использована не была.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Проектирование тканеинженерной конструкции желчного протока

3.1.1. Функциональный подход к проектированию ТИК желчного протока

Сверхсложность организации внутренней структуры крупных биологических объектов обуславливает возникновение проблем при попытках полноценной реконструкции структуры и функций нативных органов и тканей. Однако животные и люди с различными дисфункциями или аномалиями тканей способны поддерживать свою жизнедеятельность при сохранении минимально необходимого функционала таких тканей. В этом случае компенсаторная реакция осуществляется за счет включения эндогенных защитно-приспособительных механизмов саногенеза, а также изменения внутриклеточного метаболизма и замещения нативных тканей [44]. Подобные факты позволяют предположить, что при создании биоинженерных трансплантатов вместо полноценного эквивалента достаточно реализовать доступными методами лишь минимально необходимые жизненно-важные свойства такой конструкции для обеспечения достаточных физиологических функций при имплантации в организм. Разработка подобных *функциональных* ТИК связана с упрощением биологической сложности разрабатываемых конструкций [89], то есть без необходимости полноценного выполнения физиологических функций и прецизионного повторения внутренней организации моделируемых тканей из слоев специализированных клеток и без точного воспроизведения внутренней микроциркуляции. Современные исследования в области закономерностей морфогенеза позволяют говорить о возможности рациональной организации внутренней структуры биоискусственных органов [52, 117], в том числе – эпителиальных [50, 319]. Последовательность задач при таком подходе к созданию ТИК желчного протока обобщенно представлена на рисунке 3.1.

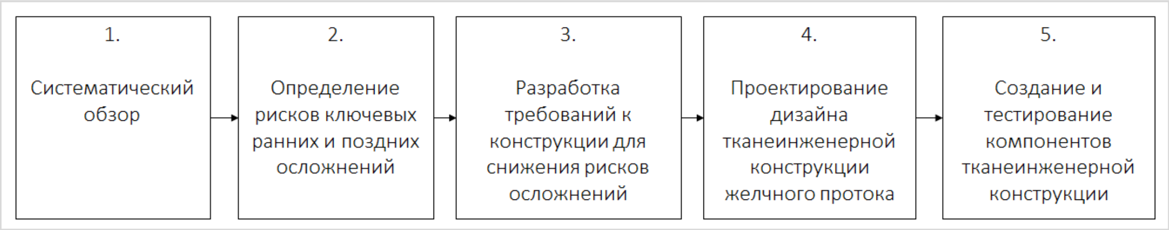


Рисунок 3.1 Последовательность задач при создании ТИК желчного протока

В соответствии с предложенным подходом была разработана последовательность исследовательских и технологических работ по созданию и изучению компонентов ТИК желчного протока, представленная на рисунке 3.2.



Рисунок 3.2 Структура работ по созданию и изучению свойств компонентов ТИК желчного протока

3.1.2. Систематизация данных об анатомии, нормальной и патологической физиологии поврежденных желчных путей

Обобщение имеющегося мирового опыта реконструктивных и восстановительных хирургических вмешательств на желчных путях было выполнено в форме базы данных «Панорамная база знаний по патофизиологии реконструктивных и восстановительных операций на желчных путях», в которую вошли 1264 научные работы, опубликованные в рецензируемых изданиях и

индексируемые в базах PubMed, Google Scholar и РИНЦ. Разработанная база данных содержала сведения о клинических исследованиях и наблюдениях в период 1892-2018 гг., а также экспериментальные и лабораторные исследования по патологической физиологии желчных путей. Структура разработанной базы данных представлена на рисунке 3.3.



Рисунок 3.3 Структура базы данных «Панорамная база знаний по патофизиологии реконструктивных и восстановительных операций на желчных путях» по патологической физиологии желчных путей, а также исходах реконструктивных и восстановительных гепатобилиарных хирургических операций

Использование панорамного подхода позволило включить в рассмотрение работы по биологии клеток и тканей желчных путей, а также уникальные клинические и экспериментальные случаи. Немаловажным аргументом проведения работы по составлению такой базы данных являлась необходимость исключения “систематической ошибки выжившего”, которая связана с обобщением только лишь положительного опыта.

3.1.3. Разработка функциональных требований к ТИК желчного протока

Формулировка требований к объектам биоинженерии осуществляется тканеспецифично для конкретного органа с учетом накопленных исторических сведений об опыте восстановления его функций, и рисках послеоперационных осложнений. Подход функциональной многослойности предусматривает формулировку функций ТИК желчного протока, которые должны исключить осложнения, возникающие при операциях на желчных путях.

Опубликованные работы по имплантации различных материалов и оценке послеоперационных осложнений позволяют установить различные временные интервалы их проявления. Этапность и риски развития основных послеоперационных осложнений при реконструктивных и восстановительных операциях на желчных путях представлены на рисунке 3.4.

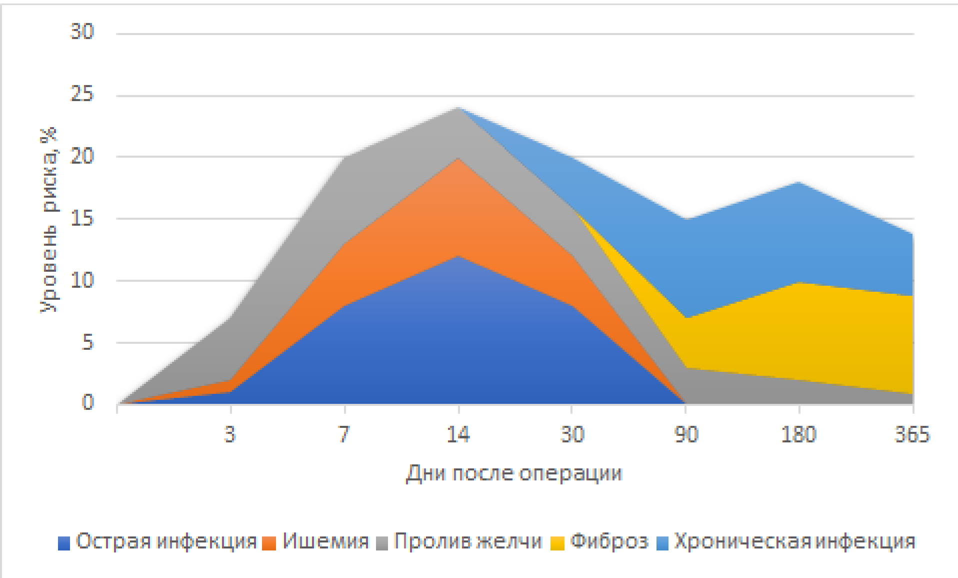


Рисунок 3.4 Этапность рисков послеоперационных осложнений при выполнении реконструктивных операций на желчных путях

Видно, что выделяются ранние (до 3 мес.) и поздние (3-12 мес.) послеоперационные осложнения. Исключение развития ранних послеоперационных осложнений требует в первую очередь обеспечения нормального кровоснабжения и механической состоятельности трансплантата и анастомоза в течение первых 3-х месяцев, а поздних – обеспечение нормальной

микроциркуляции в зоне трансплантата для функционирования эпителия и предотвращения развития хронических инфекций.

Анализ и обобщение современного опыта выполнения реконструктивных и восстановительных операций на желчных путях позволяет сформулировать требования к ТИК желчного протока, приведенные в таблице 3.1.

Таблица 3.1 Требования к ТИК желчного протока

№	Формулировка	Подробное описание
Т.1	Биосовместимость материалов конструкции	Материалы конструкции должны быть биосовместимы с тканями реципиента при имплантации в общий желчный проток.
Т.2	Непроницаемость для желчи	Конструкция должна сохранять непроницаемость для желчи в течение не менее 2-х месяцев после имплантации.
Т.3	Биодеградация материала конструкции	Материал конструкции должен деградировать в течение 6-ти месяцев, при этом его механические свойства (модуль упругости и прочность) должны снижаться запланированным образом в течение этого срока, а пластичность – сохраняться на уровне нативных тканей желчного протока.
Т.4	Васкуляризация конструкции	Уровень сосудообразования в зоне имплантации на сроках до 2-х мес. должен обеспечивать нормальный клеточный метаболизм, эпителизацию просвета и доступ иммунных клеток для борьбы с инфекционными агентами
Т.5	Новообразование нормальной соединительной ткани	Рост и созревание соединительной ткани должны обеспечивать параметры механической прочности, эпителизацию конструкции и предотвращение развития признаков фиброзирующего стеноза на сроках 3-6 мес.
Т.6	Прошиваемость материала конструкции	Свойства материала конструкции для обеспечения механической состоятельности анастомоза должны обеспечивать возможность прошивания стандартным швом при использовании хирургической нити 6-0.
Т.7	Сопряжение тканей конструкции	В конструкции должны быть созданы условия для физиологического сопряжения тканей, обеспечивающие их нормальное взаимодействие.

Некоторые из представленных требований являются качественными и не могут быть представлены в виде формальных выражений. Требование Т.2 может быть представлено как ограничение по деградации образующих непроницаемый слой волокон $d_{пленки}$ и зависит от способа формования и свойств материала, а его параметры кинетики резорбции могут быть получены лишь экспериментально. Требование Т.5 в настоящее время трудноформализуемо, а его выполнение связано

с использованием различных методов влияния на процессы нормального созревания соединительной ткани. Требование Т.6 также не может быть формально представлено в силу необходимости экспериментальной оценки механических свойств, качественной оценки морфологии материала и удобства при выполнении хирургических операций.

Таким образом, только лишь требования Т.1, Т.3, Т.4 и Т.7 могут быть представлены в виде системы уравнений. При этом выполнение требования Т.1 может быть проверено лишь экспериментально, и в общем сформулировано в виде ограничения диаметра волокон материала в течение срока имплантации $d_{min}<d<d_{max}$. Требование Т.3 может быть представлено как функция прочности $T_3(d,t)$, значение которой на сроке имплантации ограничено снизу σ_{min}. Требование Т.4 при объемной модификации материала факторами роста также может быть представлено как функция плотности сосудистой сети $T_4(d,t)$, значение которой зависит от степени резорбции волокнистого материала. Требование Т.7 также может быть выражено через параметры васкуляризации, обеспечивающие ремоделирование тканей на сроке имплантации.

3.1.4. Выбор параметров васкуляризации ТИК желчного протока

Холангиопатии ишемической этиологии составляют существенную часть патологий желчных путей [74]. Поэтому недостаточное кровоснабжение области имплантации ТИК может стать причиной развития ишемических и инфекционных патологий. Мы предположили, что значимым фактором являются физические параметры васкуляризации зоны трансплантата и проанализировали зависимости исходов по реконструкции желчных путей с использованием трансплантатов различного происхождения. Используя существующую классификацию Grolich et al. (2015) реакции тканей желчного протока в ответ на повреждения для оценки морфологических особенностей образцов (Табл. 3.2) [175], проводилась оценка значимости фактора физических значений васкуляризации.

Таблица 3.2 Шкала оценки реакции тканей желчного протока в ответ на повреждения

Баллы	Определение
4	Тяжелые диффузные повреждения – тяжелый некроз слизистой оболочки либо отсутствие эпителизации, на срезах наблюдается разросшаяся соединительная ткань. Серьезное накопление воспалительных клеток с преобладанием нейтрофилов.
3	Тяжелые и очаговые повреждения – сегментированный некроз эпителия и собственного слоя, некроз в условиях умеренной фиброплазии с рассеянными нейтрофилами, лимфоцитами и плазмоцитами.
2	Умеренное повреждение – умеренно гиперплазированный эпителий. Наблюдается от легкой до умеренной гиперплазии муцинозных гранул в собственном слое. Умеренная лимфоплазмоцитарная инфильтрация. Умеренная фиброплазия.
1	Легкие повреждения – наблюдается легкая эпителиальная гиперплазия. Слабо выраженная лимфоплазмоцитарная инфильтрация. Легкая фиброплазия в собственном слое.
0	Нормальная гистологическая структура. Слизистая оболочка выложена монослоем столбчатых эпителиальных клеток. Собственный слой инфильтрован редкими лимфоцитами и муцинозными гранулами. Тонкий слой гладкой мышечной ткани. Толстый адвентициальный слой соединительной ткани.

Обнаружено, что существенное значение для послеоперационных исходов имеют физические (морфологические) параметры трансплантатов, в том числе плотность сосудистой сети *(vessel density (VD)*, или плотность распределения сосудов), а также расстояние от просвета до сети капилляров внутри стенки (Табл. 3.3).

Таблица 3.3. Зависимость эффективности применения трансплантата от плотности сосудов и расстояния до слоя сосудистой сети

Трансплантат	Расстояние от просвета до сосудистой сети, мкм	Плотность сосудистой сети, сосудов/мм^2	Эффективность использования
Аутовена	110±40	60±10	2,7±0,6 (высокая)
Артерия	290±40	36±11	2,4±0,4 (средняя)
Сальник	430±70	33±5	1,8±0,5 (низкая)
Фасция	230±70	30±5	1,7±0,3 (низкая)
Желчный проток	105±15	87±22	3,1±0,4 (высокая)

В полученной выборке большая плотность сосудистой сети достоверно была критерием снижения риска послеоперационных осложнений. Рассчитанные коэффициенты корреляции для параметров васкуляризации приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 Соответствие результативности реконструктивных операций с физическими характеристиками трансплантатов желчного протока

Параметр	Коэффициент корреляции Пирсона	Значение для тканей желчного протока
Физическое расстояние от просвета до васкуляризированного слоя	–0,75±0,22 (p=0,021)	105±15 мкм
2D-плотность распределения сосудов	0,92±0,08 (p=0,006)	87±22 мм$^{-2}$

Проекции функции объемной плотности распределения сосудов – расстояние от просвета до васкуляризированного слоя и 2D-плотность распределения сосудов, являлись значимыми фактором для успешности выполнения реконструкции поврежденных желчных протоков аутотканями, причем чем меньше расстояние до зоны сосудистой сети и выше 2D-плотность распределения сосудов, тем выше вероятность успеха при использовании такого трансплантата.

Требование по обеспечению межтканевого сопряжения ТИК для функционализации транспланта также может быть выражено через параметры васкуляризации [318]. Анализ литературных данных позволил оценить характерный уровень межтканевых различий в васкуляризации различающихся по своему функционалу нормальных и патологически измененных тканей как 1,6±0,3 (p<0,05).

3.1.5. Рациональный дизайн ТИК желчного протока

С целью проектирования ТИК желчного протока был выполнен анализ ключевых параметров такой конструкции относительно ее биологических и физиологических эффектов. Сделано предположение, что использование биодеградируемых и биосовместимых материалов для создания каркасов многослойных ТИК, различных методов заселения клетками и способов включения в материал БАС позволяет создавать многослойные конструкции, которые снизят риски развития осложнений. Одним из недостатков данного подхода является нестабильный выход БАС из структуры полимера. Решить данную проблему могло бы использование схемы управления выхода БАС с отрицательной обратной связью, в которой слишком быстрая деградация волокон полимера тормозится

метаболитами этих полимеров, тем самым стабилизируя параметры деградации в приемлемом диапазоне.

Следует отметить, что биодеградация полиэфиров приводит к высвобождению кислот, еще более способствующих разрушению полимеров в результате автокаталитической деградации [332], формируя петлю положительной обратной связи. Мы предположили, что включение в материал каркаса каких-либо ингибиторов накопления в тканях продуктов гидролиза может способствовать снижению уровня автокаталитической деградации. Примером физиологически опосредованного ингибитора автокаталитической деградации могут служить факторы роста сосудов, стимулирующие неоваскуляризацию и удаление продуктов биодеградации из зоны резорбции полимера [388]. Основанная на данном принципе схема с отрицательной обратной связью может выглядеть как показано на рисунке 3.5.

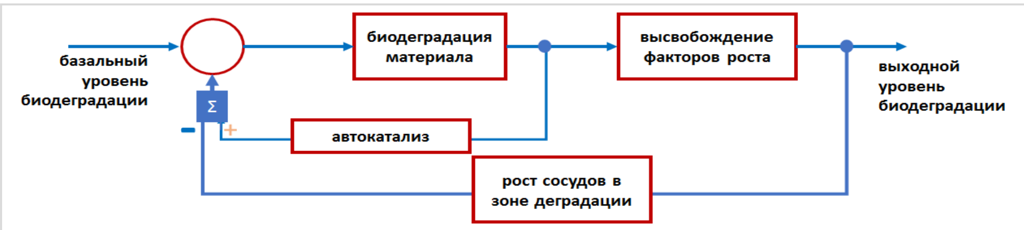


Рисунок 3.5 Контур управления биорезорбцией материала полимерного каркаса с двумя петлями параметрической обратной связи – положительной и отрицательной

Подбор условий параметрической обратной связи – положительной (темпы биодеградации) и отрицательной (концентрация ингибиторов биодеградации, в том числе сосудистых факторов роста) позволяет создавать каркасы с авторегулируемой степенью биорезорбции. Например, заселение конструкции ММСК КМ приведет к снижению воспаления в зоне имплантации [296] и тем самым будет способствовать снижению уровня ферментативного гидролиза полимерных материалов конструкции. Введение в конструкцию ангиогенного фактора VEGF также может снижать степень автокаталитической деградации за счет усиления локального кровоснабжения. Требования к материалу конструкции

могут быть представлены как функции резорбции (уменьшения диаметра волокон со временем) материала $d(t)$. Данная функция будет непрерывной и убывающей на интервале $[0; +\infty)$, при этом $d'(t)<0$, а $\lim_{t\to+\infty} d(t)=0$.

Поскольку важным требованием к свойствам имплантируемой конструкции является предотвращение развития рестеноза, то значимым требованием к материалу конструкции будет являться эпителизация её внутренней поверхности. Из литературных данных известно, что эпителиальные клетки наилучшим образом пролиферируют на волокнах диаметром от 2 до 5 мкм [58], при этом характерный период воссоздания и созревания соединительной ткани составляет 6-12 недель [100, 314].

Реэпителизация трансплантатов желчного протока происходит с двух сторон имплантата и ее скорость составляет в среднем 1,5±0,3 мм/неделя. Следовательно, максимальная длина имплантируемой конструкции желчного протока для предотвращения разрастания соединительной ткани и развития стеноза не должна превышать 2 × 1,5 мм/неделя × 6 недель = 18±4 мм, что хорошо соотносится с опубликованными в литературе данными.

Требования к ТИК желчного протока, сформулированные в таблице 3.2, могут быть выражены через диаметр волокон (d) и плотность распределения сосудов (VD) в виде системы уравнений Ф.3.1-Ф.3.4:

$$\text{Т.1}: 2 \text{ мкм} < d < 5 \text{ мкм} \quad (\text{Ф.3.1})$$

$$\text{Т.3}: d > d_{min} \quad (\text{Ф.3.2})$$

$$\text{Т.4}: VD_{2мес.} > 85 \text{ мм}^{-2} \quad (\text{Ф.3.3})$$

Обеспечение сопряжения слоев в такой конструкции может быть выражено через параметры васкуляризации, что дает возможность выразить требование Т.7 в виде отношения различий плотности распределения сосудов в слое и окружающих тканях в период созревания соединительной ткани:

$$\text{Т.7}: VD_{слоя}/VD_{окр.тк.} > 1{,}3, \quad t\in(T_1; T_2) \quad (\text{Ф.3.4})$$

Выполнение различных требований к материалу ТИК должно быть разделено во времени. Так, требования по васкуляризации требуют максимума высвобождения БАС из структуры материала на сроке 2-х недель после

имплантации, а требования по пролиферации - на 3-4 неделе, что может быть достигнуто при использовании композитного каркаса из материалов с различными темпами биорезорбции. Таким образом, ключевые этапы функционирования ТИК могут быть представлены следующими ключевыми точками: T_1 – максимум физиологического ангиогенного эффекта (2-я нед.); T_2 – завершение эпителизации внутренней поверхности конструкции (~8 нед.); T_3 – созревание соединительной ткани с необходимыми параметрами механической прочности коллагеновых волокон (~12 нед.). Требование отсутствия просачивания желчи требует дополнения состава конструкции непроницаемым слоем материала (пленкой), параметры резорбции которой не приведут к изменению ее непроницаемости в течение 12-20 недель. Дизайн трехслойного каркаса ТИК желчного протока на основе различий в резорбции материалов представлен на рисунке 3.6.

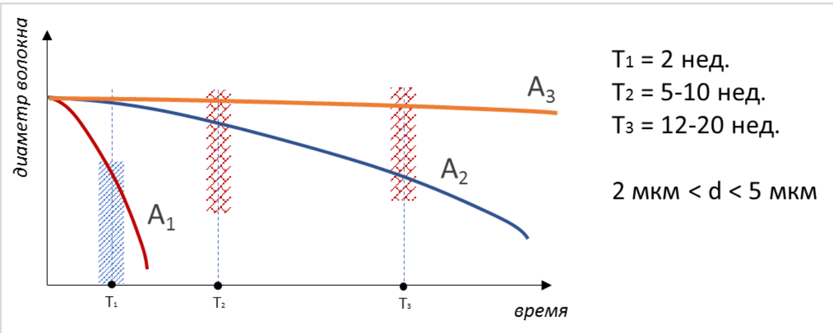


Рисунок 3.6 Дизайн трехслойного каркаса ТИК желчного протока: показаны характерные функции резорбции композитного каркаса из трех видов материалов (A_1, A_2, A_3) с различными свойствами

Таким образом, на основе полученных из литературных данных сведений об условиях использования и ключевых послеоперационных рисках был разработан дизайн ТИК в составе непроницаемой пленки (A_3) и двух слоев волокнистого материала с различными свойствами резорбции, при этом наиболее быстро деградирующий слой (A_1) должен быть модифицирован БАС для стимулирования васкуляризации, а медленно деградирующий слой (A_2) должен обеспечивать пролиферацию эпителиальных клеток в течение 8 недель, непроницаемая пленка должна сохранять свои свойства в течение 12 недель, а композитный материал в

целом должен обеспечивать механическую прочность конструкции в течение 12 недель после имплантации. При этом модуль упругости многослойного каркаса может быть рассчитан как среднее арифметическое взвешенное параметров каждого слоя, для которых весами являются толщины слоев (Ф.3.5).

$$E_{\text{каркаса}} = \frac{E_1 \times h_1 + E_2 \times h_2 + E_3 \times h_3}{h_1 + h_2 + h_3} \qquad (Ф.3.5)$$

Полученные результаты позволяют обосновать подход к функциональной многослойности ТИК на основе требований к условиям экспозиции *in vivo*.

3.2. Выбор и оценка биосовместимости материалов для изготовления каркаса ТИК желчного протока

Метод электроформования применяется в медицине для создания медицинских изделий различного назначения [204, 258]. Природные полимеры используются для создания волокнистых материалов в связи с высокой степенью их биологической совместимости [73], однако их практическое использование связано с необходимостью индивидуального подбора растворителя, не нарушающего структуру и свойства мономеров. В то же время, в литературе уже известны работы по созданию и оценке *in vitro* и *in vivo* билиарных имплантатов на основе биодеградируемых и биосовместимых полимерных материалов, в которых синтетические материалы показали отсутствие клеточной цитотоксичности и физиологическую совместимость [69, 257, 357, 395].

С целью выбора материала для создания образцов каркаса ТИК были рассмотрены ПКЛ, ПДЛГА, ДАЦ, PLLGA и PLCL, которые по литературным данным могут представлять значительный интерес [23, 395]. На основе этих материалов на базе лаборатории полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт» (заведующий лабораторией – д.ф.-м.н., проф. Чвалун С.Н.) были изготовлены биосовместимые плоские и трубчатые каркасы.

С целью изучения цитосовместимости материала, биологической совместимости *in vivo*, а также тканеспецифичной физиологической совместимости для исключения тканеспецифичных эффектов, была предложена многоэтапная схема оценки свойств материала, представленная на рисунке 3.7.

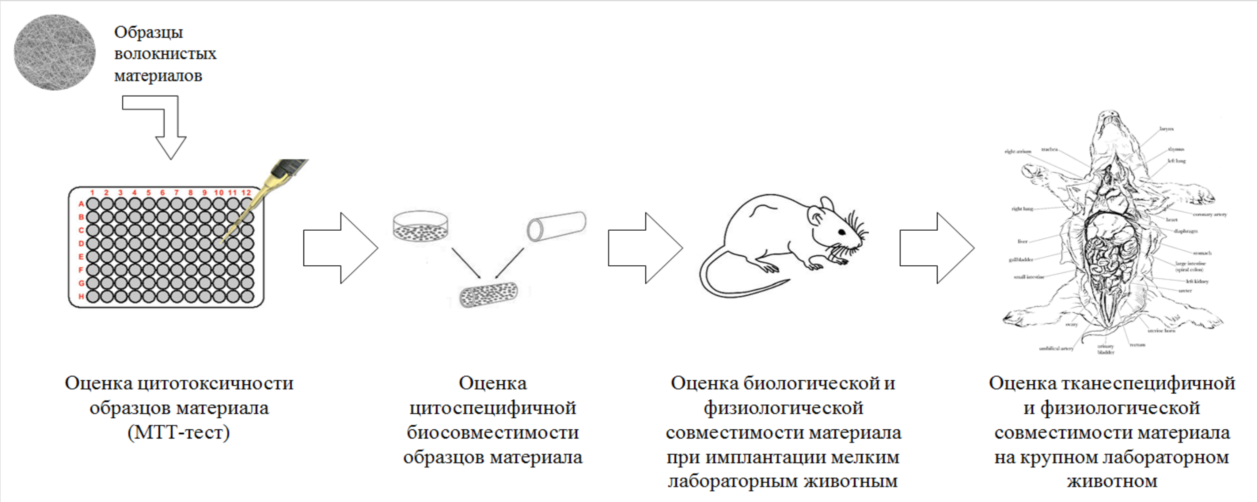


Рисунок 3.7 Схема оценки биологической и тканеспецифичной физиологической совместимости синтетических материалов

3.2.1. Создание волокнистых каркасов методом электроформования

Обычно метод электроформования применяют к раствору, а не расплаву полимера, потому что, во-первых, для поддержания полимера в расплавленном состоянии требуется его нагрев, во-вторых, параметры раствора можно более гибко варьировать (выбирать оптимальный растворитель, концентрацию распыляемого полимера, концентрацию добавок для влияния на электропроводность и поверхностное натяжение и т.п.) [330]. Также существует ряд более тонких параметров процесса, которые можно варьировать для получения пленок с жестко заданными характеристиками: температура и влажность в камере распыления, скорость вращения барабана коллектора, геометрия сопла и т.д.

3.2.2. Скрининговое исследование биосовместимости волокнистых образцов с использованием клеточных линий NIH/3T3 и MCF-7

Определение оптимальных образцов проводили на основе МТТ-теста с использованием двух стандартизованных линий клеток стромального (NIH/3T3) и эпителиального (MCF-7) происхождения. Совместимость имплантированного материала для данных типов клеток является значимым фактором для обеспечения интенсивной васкуляризации и нормального ремоделирования ВКМ тканей

эпителиальных органов [183]. Морфология поверхности полученных электроформованием микроволокнистых каркасов из различных материалов представлена на рисунке 3.8.

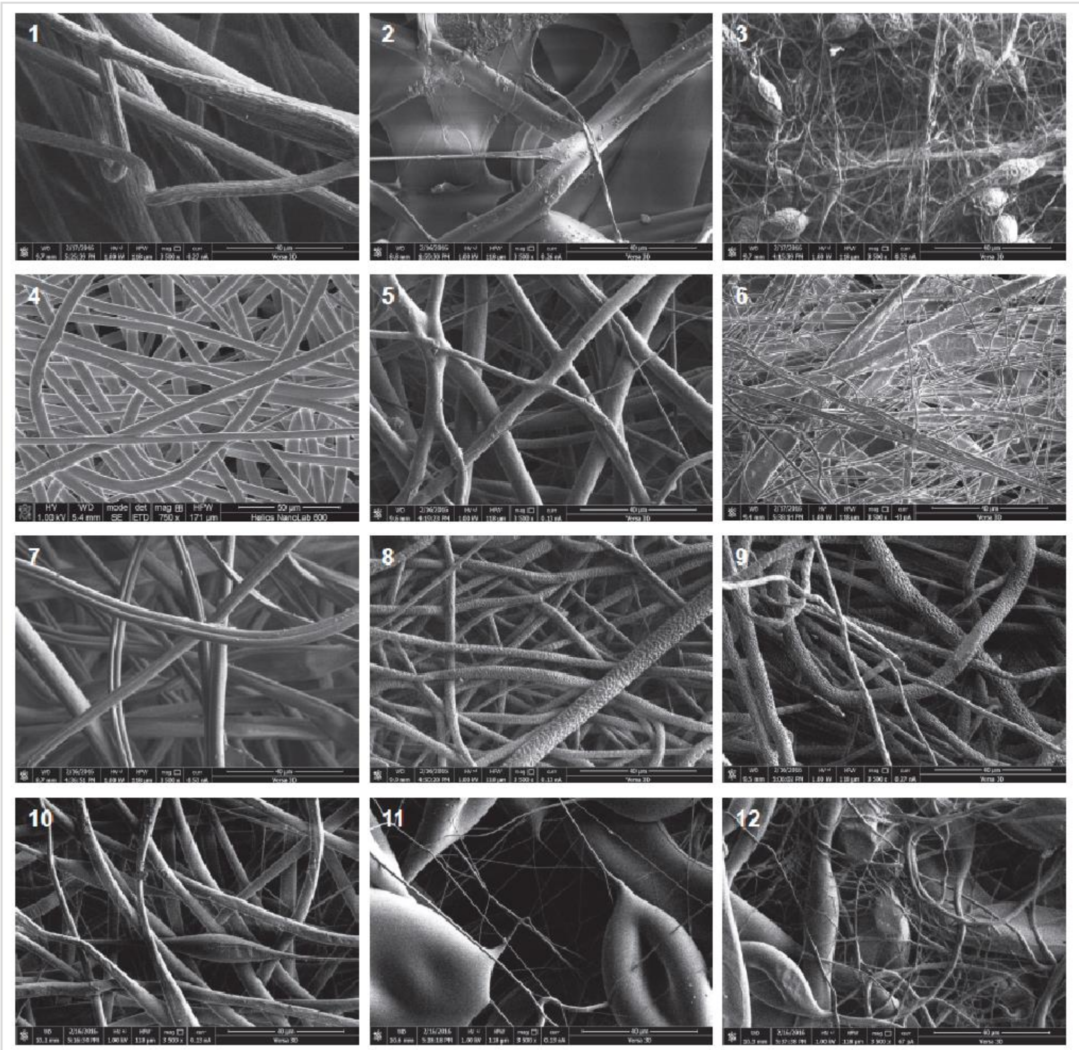


Рисунок 3.8 Полученные электроформованием каркасы: № 1–3, 5, 6 – ПКЛ; № 7 – ДАЦ; № 8, 9 – ПДЛГА+; № 4, 10 – ПДЛГА; № 11, 12 – PLCL. Сканирующая электронная микроскопия

Полученные волокнистые материалы были исследованы с помощью двух разных линий клеток путем проведения МТТ-теста (Табл. 3.5).

Таблица 3.5 Характеристики сформованных волокнистых каркасов

Материал	Средний диаметр волокна, мкм	Размер пор (max), мкм	Пористость, %	Толщина материала, мкм	Площадь поверхности ×10^3, м^2	Масса, мг
№1-ПКЛ	14.5±6.5	80	90	770	0.64	2,8
№2-ПКЛ	12.1±7.1	38.7	79	250	0.58	2,1
№3-ПКЛ	0.44±0.24	9.3	85	180	-	1,1
№4-ПДЛГА	5.3±1.3	38	81	400	0.65	1,1
№5-ПКЛ	3.6±2.2	36	83	530	3.11	3,6
№6-ПКЛ	1.3±1.5	33	90	860	6.32	2,5
№7-ДАЦ	6±2.4	38.7	95	700	0.87	1,7
№8-ПДЛГА+	2.7±1.1	7.3	84	230	1.73	1,5
№9-ПДЛГА+	3.5±1.2	10.2	84	480	3.35	3,7
№10-ПДЛГА	4.2±1.6	16.6	81	220	1.05	1,4
№11-PLCL	0.48±0.38	-	83.2	210	-	2,2
№12-PLCL	1.8±1.2	-	83.6	430	-	3,1

Полученные материалы были исследованы с помощью двух линий клеток путем проведения МТТ-теста в трех повторах на каждую точку (Рис. 3.9).

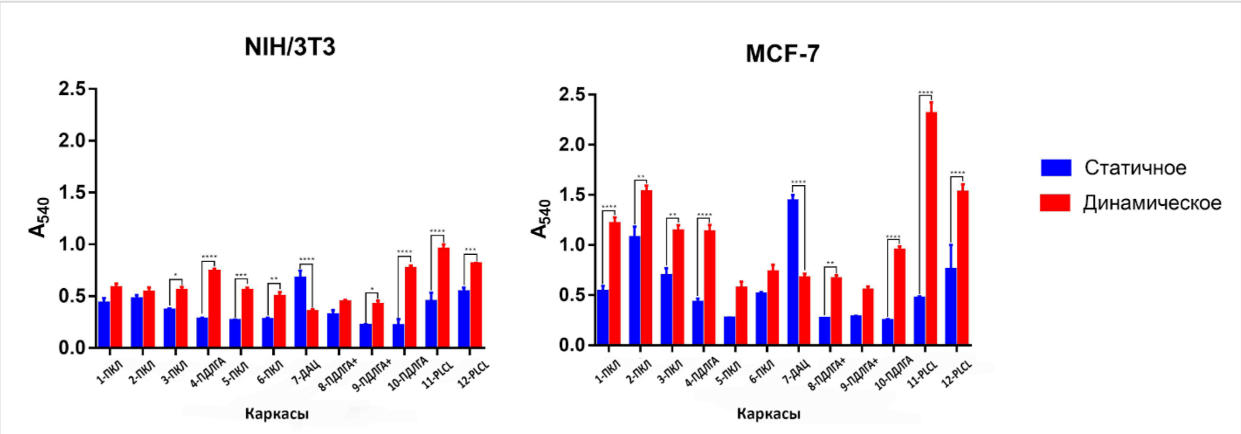


Рисунок 3.9 Графики значений поглощения при длине волны 540 нм (A_{540}) по результатам МТТ-теста на линиях клеток NIH/3T3 и MCF-7 после 7 суток культивирования в статичном и динамическом режимах с исследуемыми каркасами. *$p<0.0332$, **$p<0.0021$, ***$p<0.0002$, ****$p<0.0001$. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего

При скрининговом исследовании с использованием линий NIH/3T3 и MCF-7 было показано статистически значимое увеличение эффективности заселения каркасов №№ 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12 и №№ 1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, 12 культурами клеток

NIH/3T3 и MCF-7, соответственно, при динамическом культивирование по сравнению со статичным культивированием (Рис. 3.12).

Корреляционный анализ между линиями клеток NIH/3T3 и MCF-7 при статичном и динамическом методах культивирования на каркасах показал положительную корреляционную зависимость между фибробластоподобными и эпителиальными клетками при культивировании на исследуемых каркасах (Рис. 3.10). Коэффициенты корреляции Пирсона (r) составили 0.7918 (p=0.0021) и 0.873 (p=0.0002) для статичного и динамического культивирования соответственно.

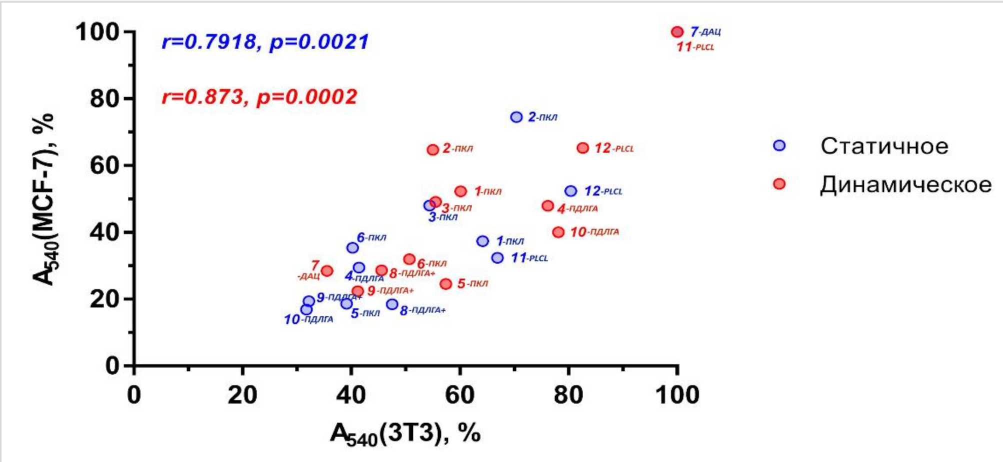


Рисунок 3.10 График корреляций между значениями оптической плотности культур клеток NIH/3T3 и MCF-7 при статичном и динамическом методах культивирования на каркасах. Значения представлены в процентах относительно максимальных значений оптической плотности при статичном и динамическом методах культивирования. r – коэффициент корреляции Пирсона

На основании полученных результатов выбраны волокнистые материалы, наиболее подходящие для заселения фибробластами и эпителиальными клетками при статичном и динамическом методах культивирования. Для фибробластов при статичном методе культивирования – №№ 1, 2, 7, 11 и 12 (ПКЛ, ДАЦ и PLCL); при динамическом – №№ 4, 10, 11 и 12 (ПДЛГА и PLCL). Для эпителиальных клеток при статичном методе культивирования – №№ 2, 3, 7 и 12 (ПКЛ, ДАЦ и PLCL); при динамическом – №№ 1, 2, 3, 4, 11 и 12 (ПКЛ, ПДЛГА, PLCL). При статичном

культивировании MCF-7 и NIH/3T3 не было выявлено разницы в пролиферации клеток на каркасах из ПДЛГА с диаметром волокон в пределах 1,6–6,0 мкм.

3.2.3. Цитосовместимость волокнистых каркасов для ММСК КМ и ЭКЖП человека

Оценка цитоспецифичной биосовместимости электроформованных материалов для чувствительных к морфологии поверхности материала клеток ММСК КМ и ЭКЖП была проведена на трубчатых волокнистых каркасах из ПДЛГА для ММСК КМ, и ПКЛ для ЭКЖП, соответственно. Образцы волокнистого ПДЛГА заселяли ММСК КМ в режиме динамического культивирования. Заселенные на материал клетки в основном адгезированы на поверхности, видны единичные клетки, проросшие вглубь материала (Рис. 3.11).

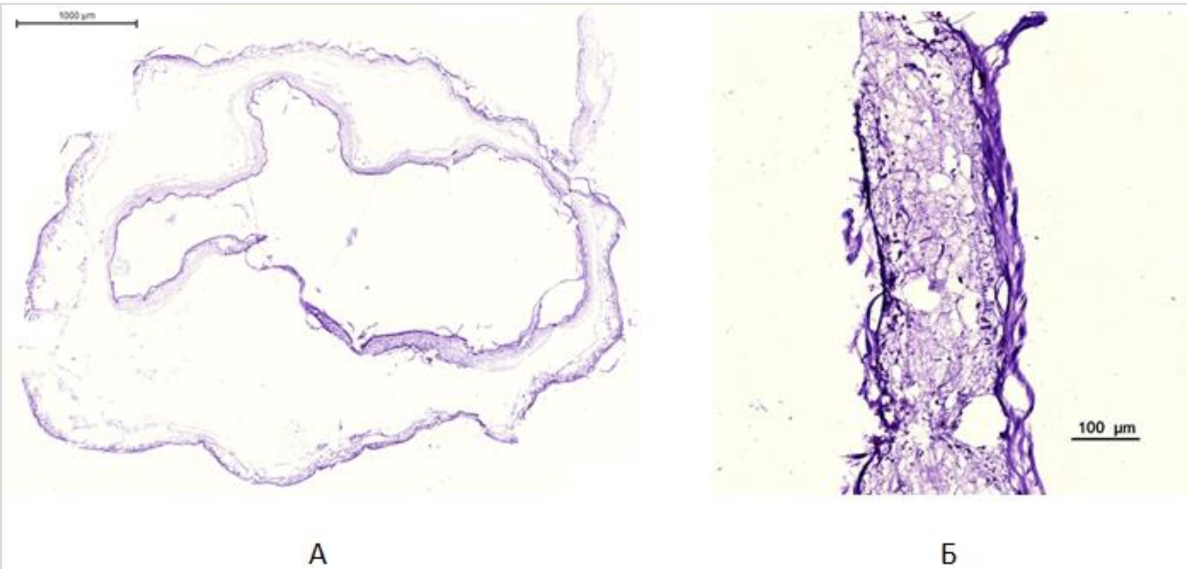


Рисунок 3.11 Образец волокнистого ПДЛГА, заселенный ММСК КМ. Окраска гематоксилином и эозином: А) трубчатый каркас, Б) увеличенный фрагмент стенки

Образцы волокнистого материала с заселенными ММСК КМ исследовали методом электронной микроскопии для детального изучения клеточной морфологии на поверхности материала (Рис. 3.12). Показано, что клетки адгезируются и распластываются по поверхности материала.

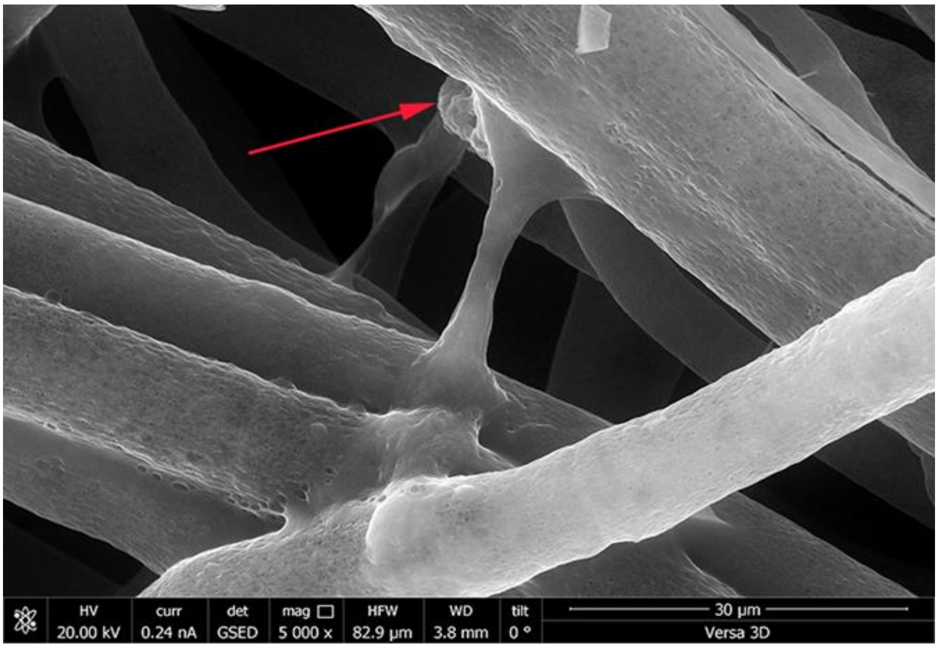


Рисунок 3.12 Волокнистый ПДЛГА с заселенными ММСК КМ. Стрелкой показано клеточное ядро. СЭМ

На рисунке 3.13 показан участок трубчатого каркаса из волокнистого ПДЛГА с заселенными ММСК КМ, окрашенными антителами к маркерам ММСК КМ человека с метками FITC (зеленые) и PE (оранжевые). В качестве контроля использовались негативные маркеры CD3 и CD19. Клетки распластаны по поверхности, часть клеток присутствует внутри стенки волокнистого каркаса.

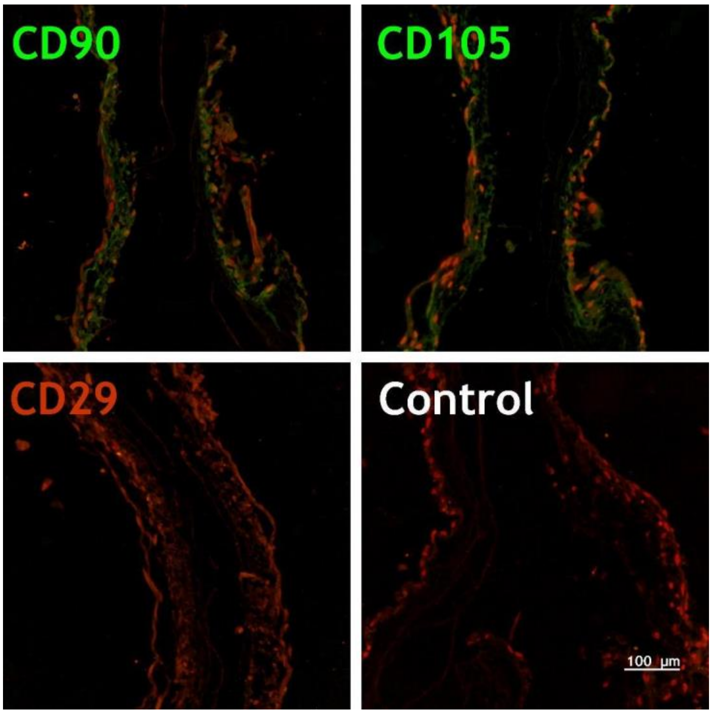


Рисунок 3.13 Волокнистый ПДЛГА, заселенный ММСК КМ человека. Окраска на CD90, CD105, CD29 антителами с метками FITC (зеленые) и PE (желто-оранжевые). В качестве контроля негативные маркеры CD3 и CD 19. Ядра клеток окрашены бромистым этидием (оранжевый). Увеличение ×40

Каркас из волокнистого ПКЛ заселяли ЭКЖП человека в режиме тканевого культивирования. Анализ заселения каркаса клетками проводили с помощью конфокальной микроскопии и предварительного окрашивания ядер клеток флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Рис. 3.14).

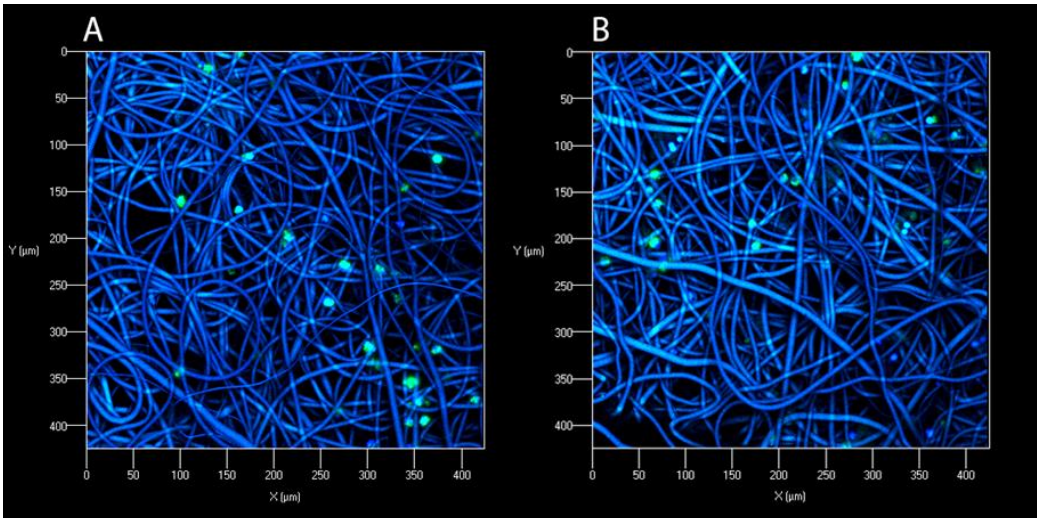


Рисунок 3.14 Волокнистый ПКЛ, заселенный ЭКЖП человека: А – совмещение в Z-проекции 17-и изображений с шагом 1.27 мкм, размер изображения 425.1 мкм; В – совмещение в Z-проекции 35-и изображений с шагом 1.27 мкм, размер изображения 425.1 мкм. Прижизненная окраска ядерным красителем Hoechst 33342. Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss, Confocal lens 20x/0.8 M27. Увеличение ×200

Показано, что и ЭКЖП, и ММСК КМ заселяли волокнистые материалы на основе ПКЛ и ПДЛГА, соответственно, как на поверхности, так и в объеме.

3.2.4. Биологическая совместимость волокнистого поликапролактона для тканей мелких лабораторных животных

Морфологическое исследование образцов участков имплантации материала на всех временных точках эксперимента *in vivo* (7, 16, 33, 46 и 64 сут) показало отсутствие признаков гнойного воспаления или асептического некроза (Рис. 3.15). Присутствие в образцах единично определяющихся нейтрофилов и отсутствие микробных колоний говорит о минимальной цитотоксичности материала.

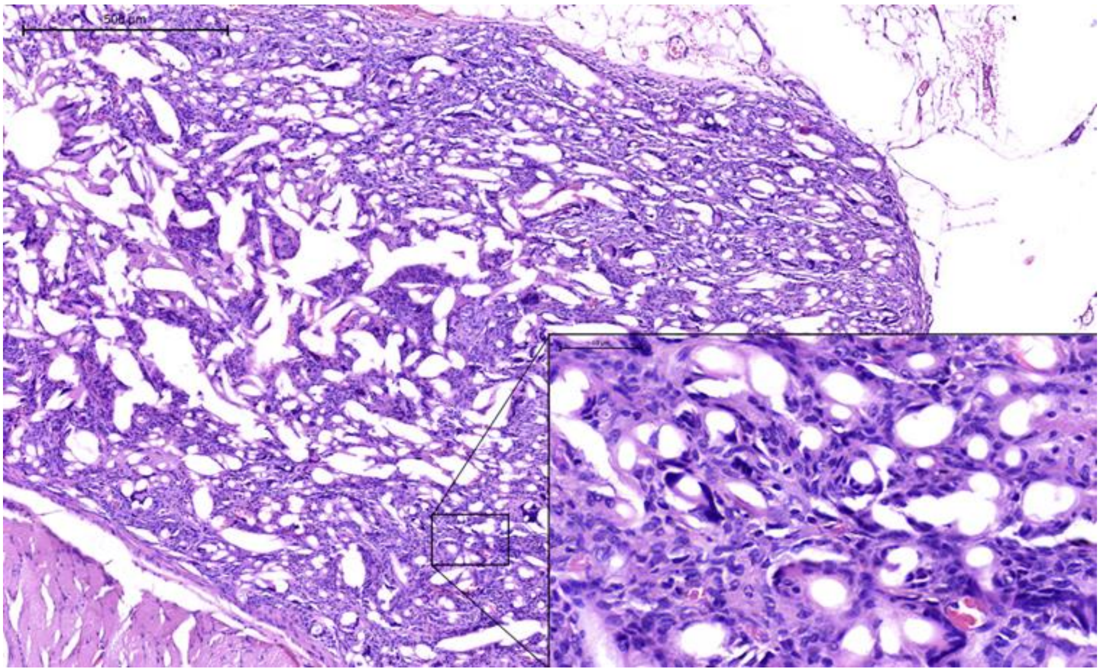


Рисунок 3.15 Гистологический препарат участка имплантации ПКЛ-каркаса с низкой концентрацией препарата НВГ, 33 сутки после имплантации. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение ×50-400

Изучение имплантированных образцов волокнистого материала крысам показало значимую эрозию материала на сроке 64 суток, выраженную в неразличимости контура имплантатов невооруженным глазом.

На рисунке 3.16 представлены микрофотографии образцов контроля и модифицированных высокой концентрацией препарата НВГ волокнистых материалов, извлеченных на 16-е и 64-е сутки после имплантации. Видно, что на 16-е сутки в образцах отсутствовали признаки острой воспалительной реакции. В образцах на 64-е сутки не выявлены признаки хронического воспаления.

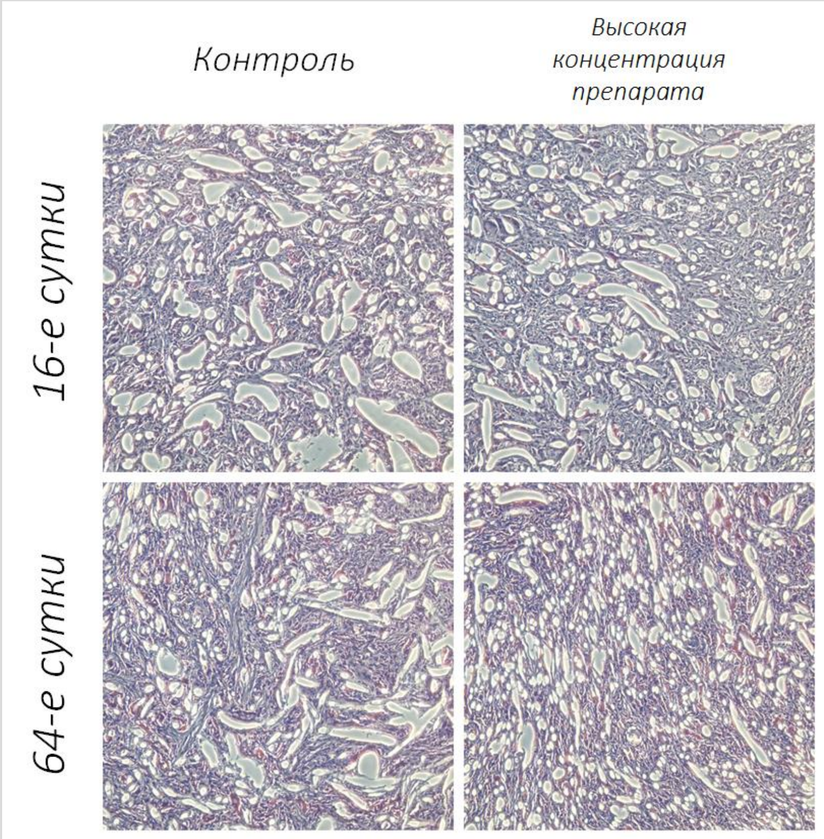


Рисунок 3.16 Образцы эксплантированного волокнистого каркаса на 16-е и 64-е сутки после имплантации: контроль и ВКп. Фазовый контраст. Увеличение ×100

3.2.5. Тканеспецифичная совместимость каркаса из волокнистого поликапролактона на модели повреждения желчного протока свиньи

В данной работе в качестве экспериментальных моделей рассматривались свиньи ввиду их анатомического и физиологического сходства с организмом человека [93]. В Научном центре биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (руководитель – д.м.н., проф. Каркищенко В.Н.) проведено изучение анатомического строения желчных путей мини-свиней, проведена оценка соответствия параметров свиных желчных путей – желчным протокам человека и подтверждено анатомическое соответствие внутренних органов мини-свиньи возрастом от 7 до 10 месяцев организму взрослого человека (Рис. 3.17).



Рисунок 3.17 Экспериментальное исследование анатомии желчных путей мини-свиньи в виварии ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

Ранее в экспериментальных работах было установлено, что физические свойства желчных протоков мини-свиней возрастом от 7 до 10 месяцев наиболее близки к соответствующим параметрам протока у человека [237]. Однако поскольку мини-свиньи чувствительны к условиям проведения операции и послеоперационному ведению, было принято решение проводить дальнейшее исследование тканевой биосовместимости каркасов на свиньях подвида *Sus scrofa domesticus* (домашние свиньи), для чего на базе Центрального вивария Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России на домашней свинье возрастом 12 месяцев и массой 60 кг было выполнено моделирование интраоперационной травмы (неполное пересечение общего желчного протока) и проведено стентирование волокнистым каркасом из ПКЛ, как показано на рисунке 3.18.

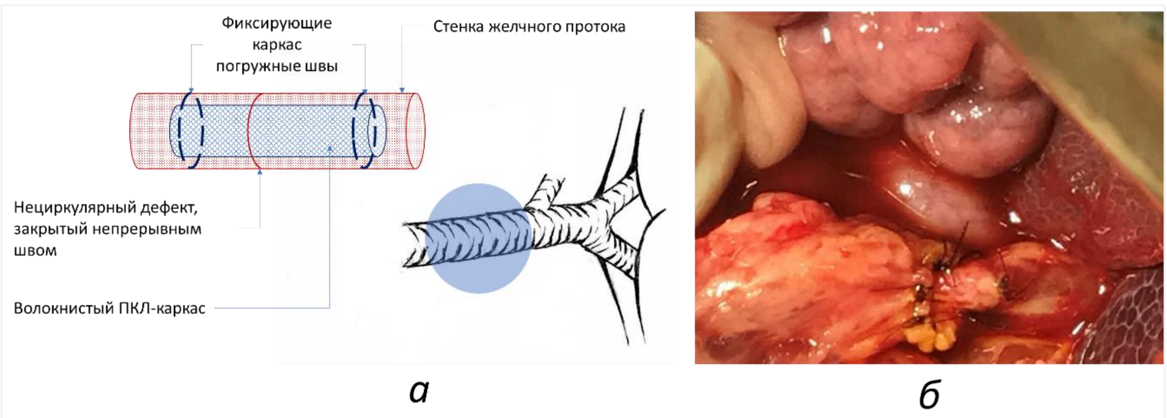


Рисунок 3.18 Имплантация ПКЛ-каркаса свинье: а) общая схема операции; б) интраоперационный вид участка желчного протока с имплантированным ПКЛ-каркасом

Спустя 1 месяц после имплантации ПКЛ-каркас с окружающими тканями был изъят и изучен гистологическими методами. Пористая структура каркаса, пропитанного желчью, и низкое количество клеточных элементов в каркасе определялись при фазово-контрастной микроскопии. Эксплантированный каркас сохранил свою целостность и был представлен однородной конструкцией, характеризующейся пористой микроструктурой и пропитанной желчью (рис 3.19). На окрашенных гематоксилином-эозином препаратах отсутствовали признаки выраженного воспаления.

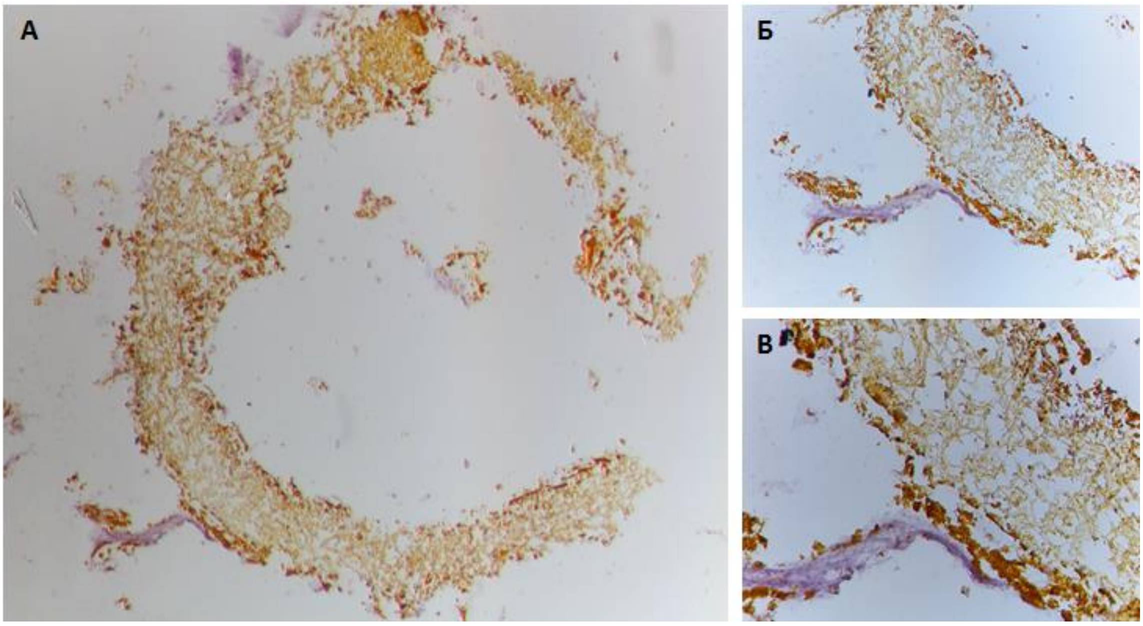
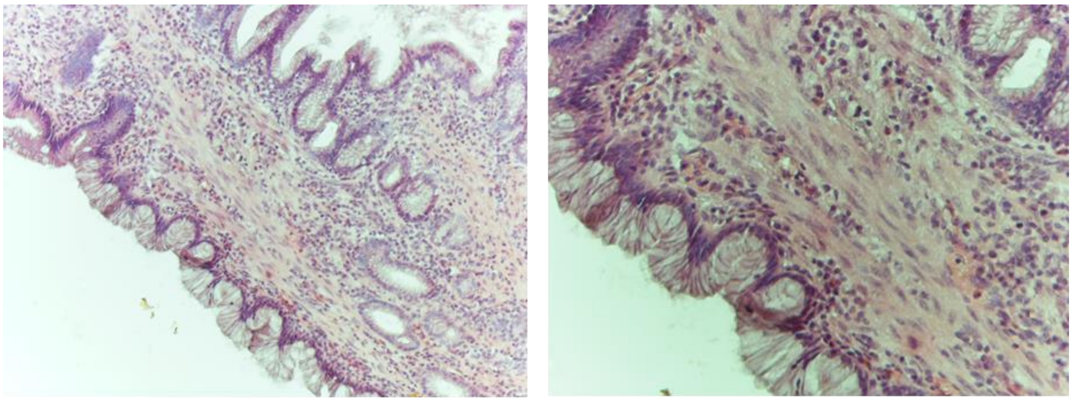


Рисунок 3.19 Препарат эксплантированного каркаса из волокнистого ПКЛ. Окраска гематоксилином-эозином: А) трубчатая структура каркаса, увеличение ×40; Б) фрагмент сегмента каркаса, увеличение ×100; В) пористая структура каркаса, увеличение ×200

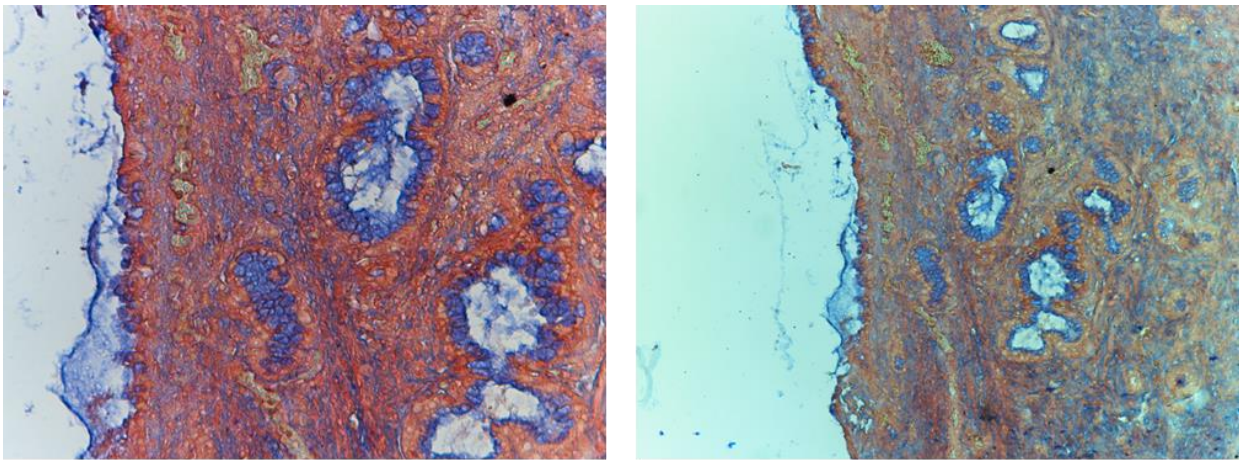
Стенка желчного протока в целом без выраженных изменений (Рис. 3.20). Нормальная структура цилиндрического эпителия желчного протока сохранена. Отмечены единичные участки инфильтрации лимфоцитами в толще стенки (Рис. 3.20), что может говорить о низкой реакции на хирургическую манипуляцию.



А Б

Рисунок 3.20 Морфология примыкавшей к ПКЛ-каркасу стенки желчного протока, окраска гематоксилином-эозином: А) Структура стенки желчного протока без патологических изменений, ×100; Б) Сплошная выстилка стенки желчного протока цилиндрическим эпителием, ×200

Отмечаются участки стенки желчного протока с дистрофией эпителиального слоя и отложениями на них фибрина (Рис. 3.21). Данный эффект мог быть получен в результате миграции клеток нативного эпителия желчного протока на имплантированный ПКЛ-каркас ввиду его цитосовместимости.



А Б

Рисунок 3.21 Морфология примыкавшей к ПКЛ-каркасу стенки желчного протока. Окраска по Маллори: А) Увеличение ×200, Б) Увеличение ×100

Образец участка стенки желчного протока, непосредственно прилегавший к имплантированному каркасу, показан на рисунке 3.22. В образце отсутствуют

видимые повреждения, признаки фиброза и кровоизлияния. Видимые участки протока с отсутствующим эпителием скорее всего были повреждены при пробоподготовке или связаны с травматичностью забора материала.

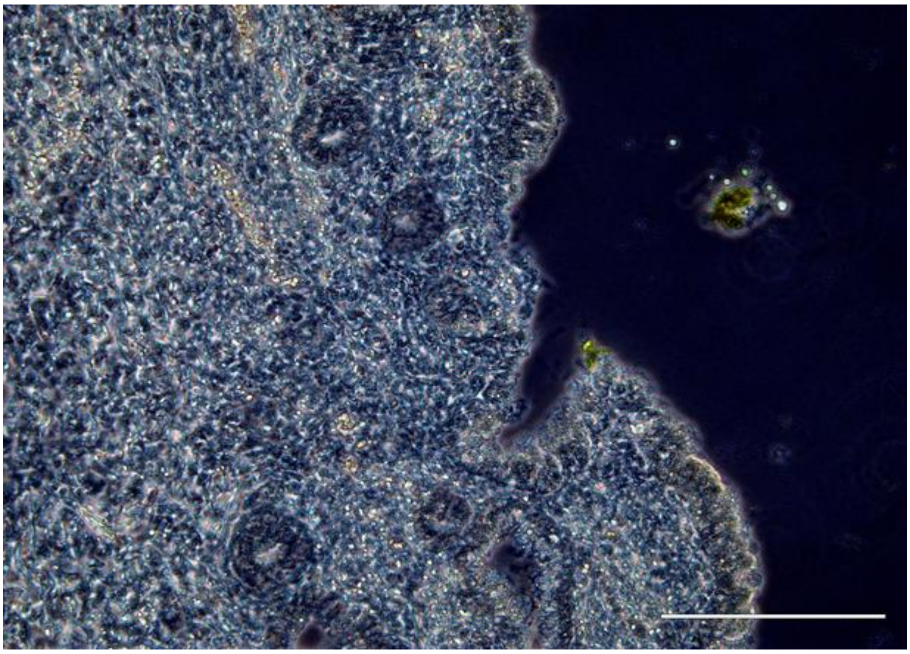


Рисунок 3.22 Образец среза люминальной поверхности образца желчного протока. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение ×100

При флуоресцентной микроскопии со специфической окраской антителами к цитокератину общему (CK-Pan) выявляются клетки нормального цилиндрического эпителия и аутофлуоресценция материала имплантированного каркаса (Рис. 3.23).

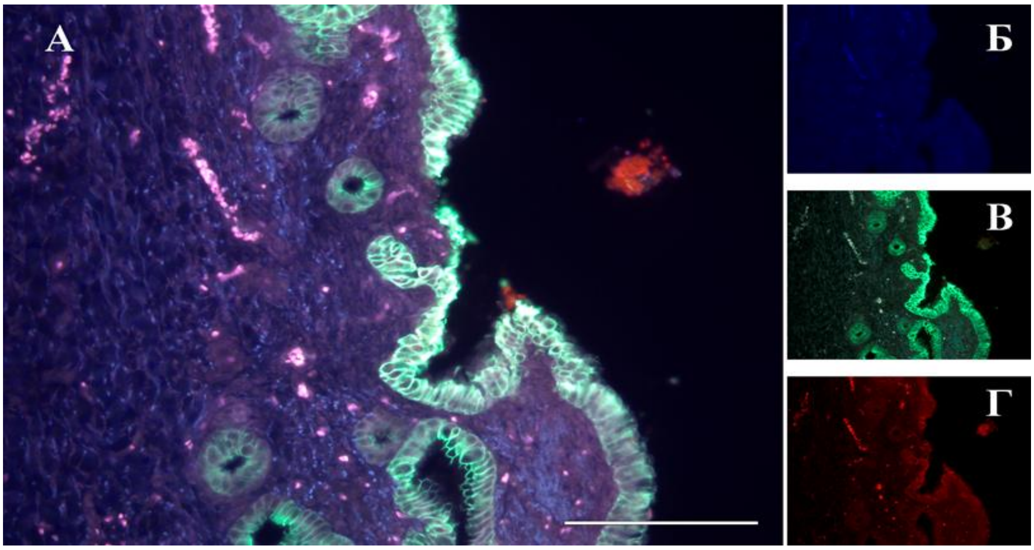


Рисунок 3.23 Образец эксплантированного образца с ПКЛ-каркасом, флуоресцентная микроскопия: А) участок каркаса, виден слой эпителиальных клеток, увеличение ×100; Б) ядра, окрашенные Hoechst 33342, В) эпителиальные клетки, окрашенные к CK-Pan, Г) аутофлуоресценция материала каркаса в красном канале

Эпителиальные клетки частично мигрировали на имплантированный каркас (Рис. 3.24), что объясняет наличие участков протока с отсутствующим эпителием на приведенном выше рисунке 3.23.

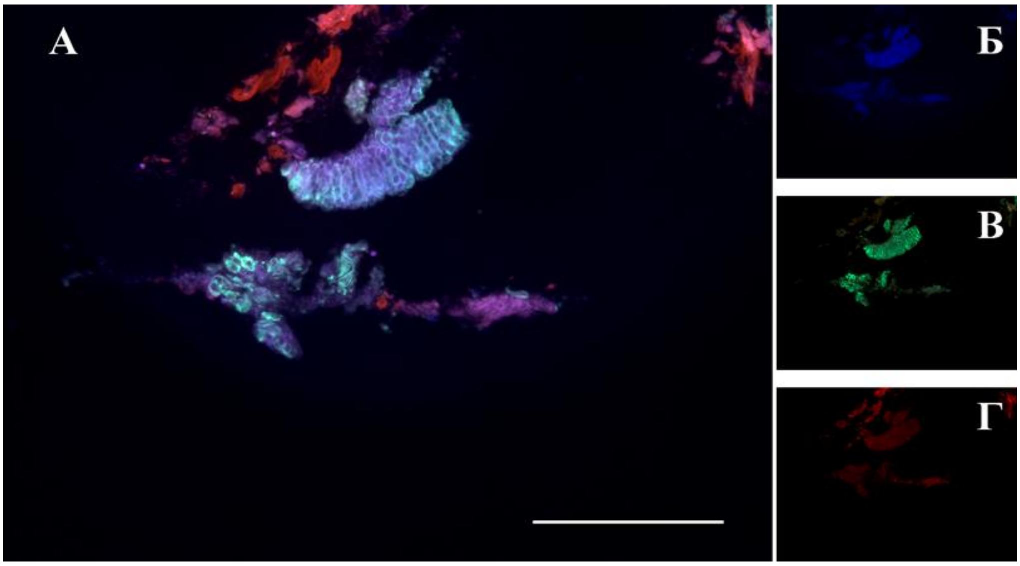


Рисунок 3.24 Образец материала ПКЛ-каркаса с пластом эпителиальных клеток, флуоресцентная микроскопия: А) материал, увеличение ×100; Б) ядра, окрашенные Hoechst 33342, В) эпителиальные клетки, окрашенные к CK-Pan, Г) аутофлуоресценция материала каркаса в красном канале

На препаратах были обнаружены участки полнокровных сосудов и обширных кровоизлияний, однако они могли быть вызваны травмой при заборе аутопсийного материала. Сидерофагов выявлено не было.

3.3. Физико-механические свойства нативных тканей и конструкций из волокнистых материалов

Обеспечение целостности и выполнение желчевыводящей функции ТИК желчного протока требует, чтобы разрабатываемые каркасы ТИК по своим механическим свойствам соответствовали своим нативным аналогам на сроках имплантации. Желчный проток, как и значительная часть других нативных тканей, обладает ярко выраженной анизотропией механических свойств в радиальном и аксиальном направлениях, связанной со строением коллагенового матрикса, что необходимо учитывать при изготовлении синтетических каркасов.

3.3.1. Механические свойства нативного желчного протока

Испытания нативного и децеллюляризованного образцов и трубчатых образцов каркасов проводили в радиальном и аксиальном направлениях. Поскольку кривые растяжения имели участки с низкой и высокой упругостью и были представлены в S-образном виде, то модуль упругости определяли на участке с максимальным наклоном. Значения механических характеристик исследованных материалов (Табл. 3.6) приведены с указанием стандартной ошибки среднего. Обозначения в таблице: σ – прочность, ε – относительное удлинение, E – модуль упругости.

Таблица 3.6 Механические параметры исследованных образцов желчного протока

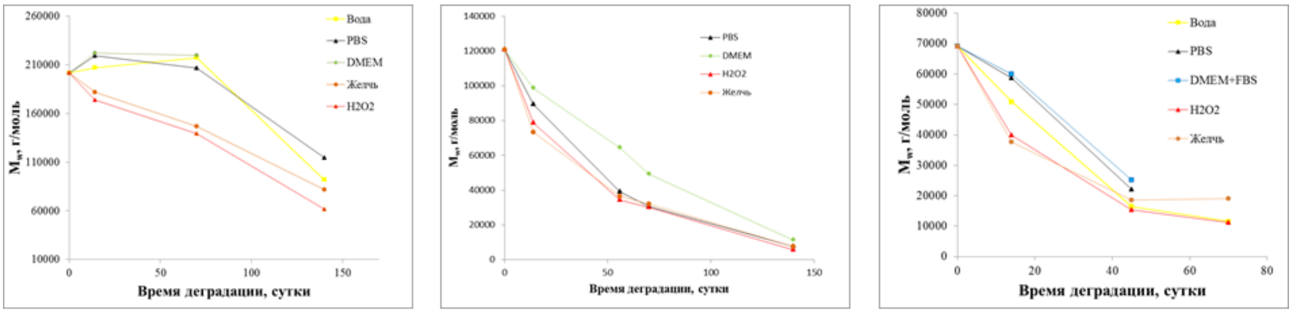
Образец желчного протока	Испытание	σ, МПа	ε, %	E, МПа
Нативный	радиально	0,75±0,15	135±14	1,2±0,2
	аксиально	4,1±0,3	32±5	22,1±1,3
Децеллюляризованный	радиально	1,3±0,2	145±11	2,4±0,2
	аксиально	6,3±0,3	35±5	29,6±1,5

Видно, что при сохранении той же пластичности децеллюляризованные образцы демонстрируют более высокие удельные прочностные и упругие свойства (становятся жестче), что может быть связано с ростом плотности образца после удаления клеток и усилением взаимодействия между отдельными фибриллами коллагенового каркаса. Это может также косвенно говорить о том, что коллагеновый каркас остается механически состоятельным в процессе децеллюляризации.

Продольная прочность нативного протока более чем в 3 раза превышает поперечную, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными по механическим характеристикам тканей животного происхождения [291]. Данное соотношение может объясняться преимущественно продольным направлением волокон в стенке протока, вдоль которого пролиферация эпителиальных клеток максимальна [377, 386]. Можно отметить согласованность полученных нами результатов с ранее опубликованными данными по изменениям механических свойств нативных и децелеллюляризованных тканей. Например, в отношении митрального клапана (овечьего) предел прочности увеличивался с 1,23 МПа до 2,12 МПа [196], а сердечного клапана свиньи с 11 МПа до 17 МПа [174]. Подобное увеличение предела прочности при растяжении объясняется изменением структурной организации волокон каркаса при децеллюляризации, отсутствием клеток и основного вещества тканей [174].

3.3.2. Резорбция и механические свойства образцов одно- и многослойных волокнистых каркасов

С целью оценки резорбции материалов были проведены испытания кинетики биодеградации экспериментальных образцов волокнистых каркасов в различных средах (воде, PBS, реактиве Фентона, DMEM и DMEM+FBS). Зависимость молекулярно-массовых характеристик образцов материалов от времени и условий деградации представлена на рисунке 3.25.



а б в

Рисунок 3.25 Изменение молекулярной массы материала каркасов на основе: а – ПКЛ; б – PLCL; в – ПДЛГА

Из представленных данных видно, что снижение молекулярной массы материала образцов ускорялось с течением времени, что могло объясняться автокаталитической деградацией. На начальном этапе деградации через 14 дней разрушение цепей наиболее интенсивно протекает в желчи и перекиси водорода (H_2O_2). При этом средневесовая молекулярная масса (M_w) ПКЛ, PLCL и ПДЛГА в PBS и клеточной среде снижается меньше либо не снижается совсем. После 45 дней молекулярная масса ПДЛГА становится ниже 26 кДа, а каркасы на его основе начинают физически разрушаться. На данном этапе деградации разница между каталитической активностью сред становится несущественной.

Похожим образом протекает деградация каркасов на основе PLCL. Примерно одинаковое падение молекулярной массы происходит в желчи, H_2O_2 и PBS. Несколько меньше молекулярная масса PLCL снижается в клеточной среде DMEM. Подобное изменение молекулярной массы PLCL сохраняется до 140 дней. При этом она становится меньше 12 кДа, а каркасы на основе PLCL полностью теряют свои механические свойства.

Заметные различия наблюдаются в характере деградации ПКЛ. Через 140 дней средневесовая молекулярная масса ПКЛ в клеточных средах уменьшается значительно больше, чем в желчи и H_2O_2. При этом снижение молекулярной массы ПКЛ в дистиллированной воде и, особенно в PBS, существенно меньше.

Фиксировались изменения модуля упругости, прочности и относительного удлинения образцов каркасов в зависимости от состава среды и времени деградации, представленные на рисунке 3.26.

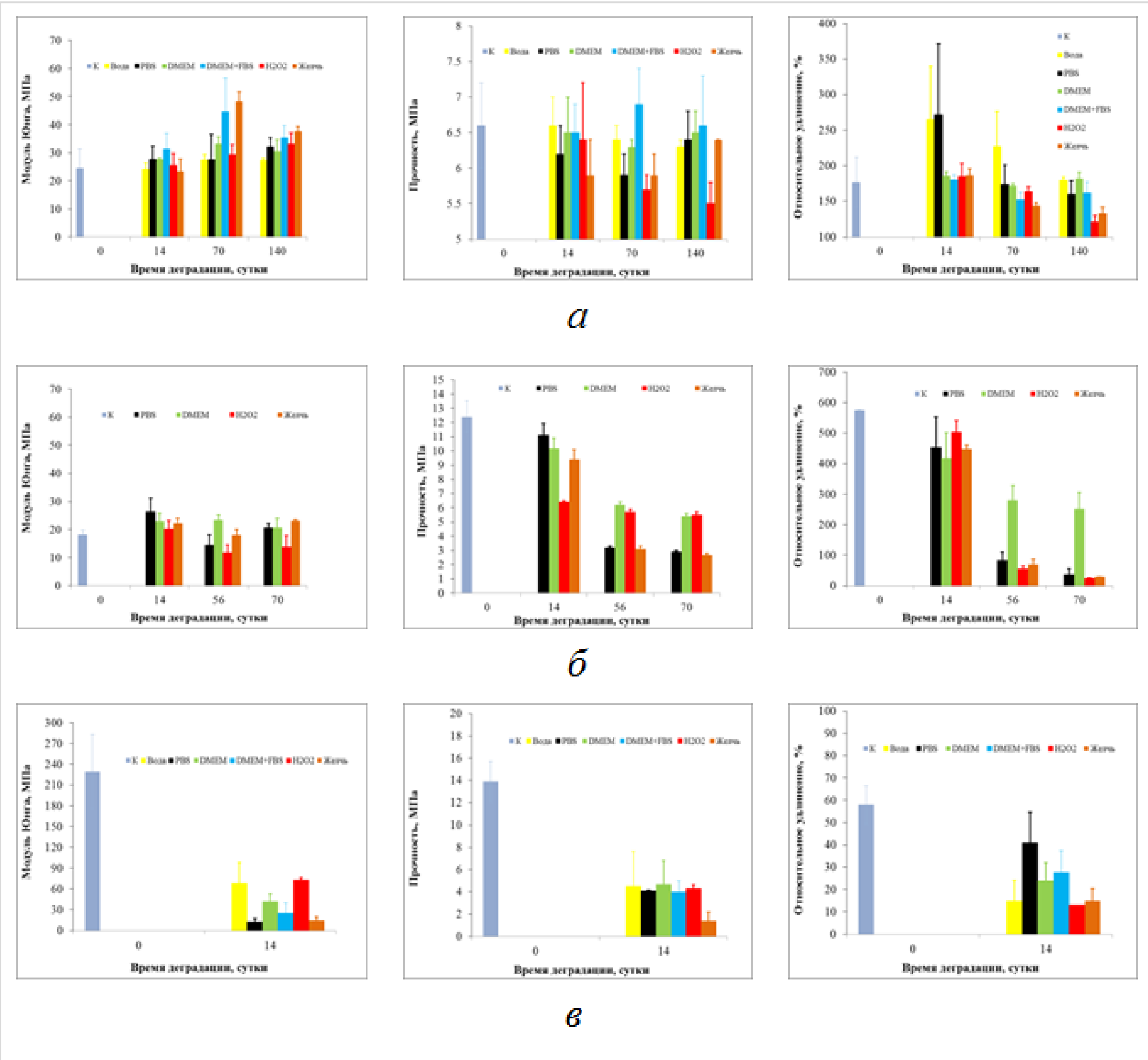


Рисунок 3.26 Зависимость изменения от условий деградации модуля упругости, прочности и разрывной деформации биосовместимых каркасов на основе: а – ПКЛ; б – PLCL; в – ПДЛГА. Контроль (К) – механические свойства исходных образцов

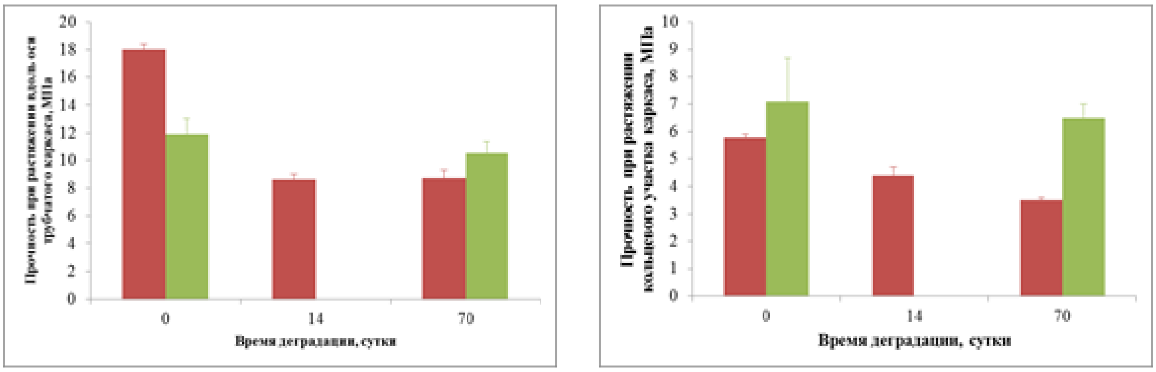
Как видно из рисунка, модуль упругости образцов на основе ПКЛ незначительно возрастает с течением времени, причем во всех средах. Модуль упругости образцов PLCL, выдержанных в средах PBS, DMEM и в желчи практически не менялся относительно начального значения на протяжении всего исследования. В среде H_2O_2 наблюдается его падение на 35-45% после 70 суток.

Прочность ПКЛ каркасов на протяжении всего эксперимента сохраняется на постоянном уровне практически во всех средах за исключением H_2O_2, воздействие которой ведет к постепенному снижению прочностных характеристик образцов. Для ПДЛГА каркасов прочность падает до предельно низких значений уже после 14 суток экспозиции. Прочность каркасов на основе PLCL уменьшается постепенно. На начальном этапе сильнее всего прочность снижается в H_2O_2, в PBS и желчи.

Относительное удлинение образцов ПКЛ через 14 дней деградации в воде и PBS существенно возрастает, однако, это сопровождается большим разбросом экспериментальных данных. В дальнейшем относительное удлинение в воде, PBS и клеточной среде DMEM с сывороткой или без нее по сравнению с контролем существенно не изменялось. В средах, содержащих более агрессивные вещества – H_2O_2 и желчь, с течением времени относительное удлинение снижается.

Визуальный анализ образцов извлеченных из желчи показал, что внешний слой трубчатых каркасов на основе ПДЛГА частично сохраняется через 14 суток после их извлечения из желчи. Спустя 70 дней внешний слой ПДЛГА каркасов полностью разрушается. Внешний слой каркасов на основе PLCL достаточно хорошо сохраняется на протяжении всего времени эксперимента.

Проведено исследование механических свойств многослойных волокнистых каркасов при экспозиции в желчи. На рисунке 3.27 представлены результаты исследования прочностных свойств многослойных трубчатых каркасов при их экспозиции в желчи в течение 14 и 70 суток. Как видно, прочностные свойства каркасов вследствие активной деградации внешнего слоя на основе ПДЛГА существенно снижаются. Прочность каркасов с внешним слоем на основе PLCL с течением времени уменьшается существенно меньше.



А Б

Рисунок 3.27 Результаты исследования прочностных свойств образцов трубчатых каркасов на основе ПКЛ-пленки, средним слоем из волокнистого ПКЛ и с внешним слоем на основе ПДЛГА (красный) или PLCL (зеленый) в зависимости от времени деградации в желчи: А) прочность при растяжении вдоль оси трубчатого каркаса, Б) прочность при растяжении кольцевого участка каркаса

Установлено, что волокнистые материалы на основе ПКЛ обладают наибольшей устойчивостью к гидролизу. Вне зависимости от характера жидкой фазы существенных массовых потерь ПКЛ-образцов, помещенных в них, в течение 140 дней не обнаружено. При этом средневесовая молекулярная масса ПКЛ начинала снижаться только через 70 дней. По своим прочностным и упругим свойствам, которые практически не меняются в процессе деградации, каркасы на основе ПКЛ соответствуют механическим характеристикам децеллюляризованного желчного протока в наибольшей степени. За аналогичный промежуток времени каркасы на основе PLCL и ПДЛГА больше склонны к гидролизу, что видно из увеличения массовых потерь и значительного снижения средневесовой молекулярной массы. При этом по модулю упругости и относительному удлинению каркасы на основе ПДЛГА и PLCL существенно отличаются от децеллюляризованного желчного протока.

В тестах на хирургическую прошиваемость *in vitro* волокнистые образцы показали удовлетворительные характеристики для дальнейшего электроформования волокон диаметром 2-5 мкм. В дальнейшем для создания каркасов ТИК желчного протока использовались ПКЛ, ПДЛГА и PLCL.

3.3.3. Физико-механические свойства экспериментальных образцов тканеинженерной конструкции

Изучение изменения физико-механических свойств каркасов проводили при их заселении ММСК КМ. Изготовлены трехслойные каркасы из ПКЛ (волокно-пленка-волокно) с различной плотностью упаковки и различным диаметром волокон (Табл. 3.7).

Таблица 3.7 Характеристики каркасов из волокнистого ПКЛ

№ образца	Состав образца	Средний диаметр волокон, мкм	Толщина стенки, мм	Пористость, %	Примечание
1	ПКЛ	2,3	0,75-0,8	89,8	без пленки
3	ПКЛ	2,3	0,75-0,8	89,8	без пленки
5	ПКЛ	2,3	0,70	91,6	с пленкой

Для определения влияния на механические свойства каркасов, заселения клетками ММСК КМ человека были проведены механические испытания исходного и заселённого ПКЛ-каркасов. Для этого использовались образцы №№1, 3, 5. Механические испытания заселенных образцов проводились во влажном состоянии, после испытания они высушивались, до постоянного веса, и взвешивались. Для возможности сравнения с исходными, последние так же испытывались во влажном и сухом состоянии. Полученные результаты представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 Механические свойства заселенных ММСК КМ и исходных каркасов

№ образца	Состав	Состояние	Продольное растяжение		Условия испытаний
			Прочность, МПа	Относительное удлинение, %	
1	ПКЛ (без пленки)	исходный	9.2±0.1	147.5±3.5	В сухом виде
		заселенный	9.3±0.2	144±1	Во влажном виде
3	ПКЛ (без пленки)	исходный	12.0±0.2	118.5±12.5	В сухом виде
		заселенный	9.2±0.6	95±20	Во влажном виде
5	ПКЛ (с пленкой)	исходный	10.5±0.6	133±4	Во влажном виде
		заселенный	12.1±0.2	394±69	Во влажном виде

Выявлено, что прочность образцов ПКЛ-каркасов во влажном виде на 10-12% меньше, чем в сухом. Заселение каркаса клетками приводит к уменьшению его прочности не более чем на 20%. Структура ПКЛ-каркасов позволяет клеткам заселять их на всю глубину. Полученные результаты показывают, что заселенные клетками каркасы (ТИК) обладают удельной механической прочностью, незначительно отличающейся от прочности нативных желчных протоков, что позволяет их использовать в экспериментах *in vivo*.

3.4. Исследование материалов, модифицированных биологически активными соединениями

3.4.1. Модификация материалов биологически активными соединениями методом эмульсионного электроформования

Получение образцов модифицированных волокнистых каркасов потребовало объемного инкорпорирования БАС в структуру полимерного материала. Из опубликованных ранее работ было известно, что из растворов ПКЛ можно получать волокна диаметром от 2 до 24 мкм [3]. На основании проведенных экспериментов удалось определить состав эмульсии ХФ/PBS+ПАВ, а также режим диспергирования, позволявший включать в структуру таких волокон дисперсионную фазу с БАС. Анализ дисперсного состава приготовленной эмульсии (Рис. 3.28) показал, что приблизительно 95% частиц имеют размер менее 1000 нм. Размеры остальных частиц находятся в диапазоне от 1000 до 7000 нм.

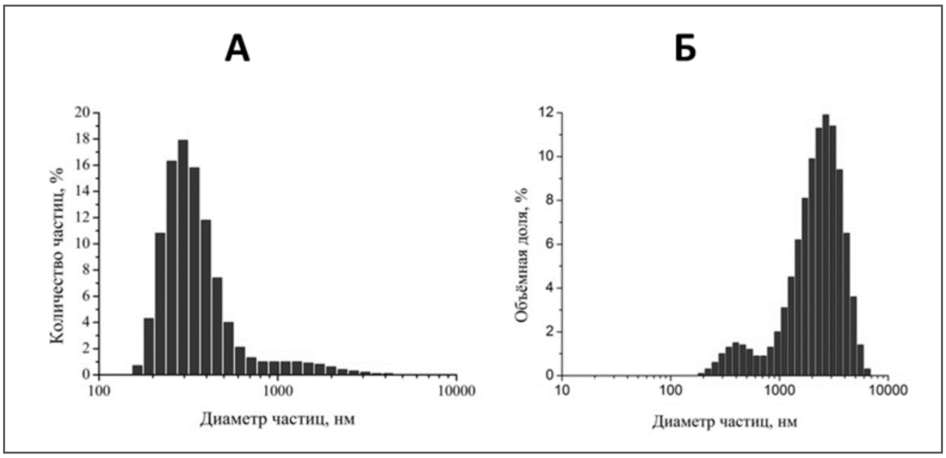


Рисунок 3.28 Гистограммы распределения частиц: А) по размерам; Б) по объему

Изображения волокон, содержащих GFP, полученные методом флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии, представлены на рисунке 3.29.

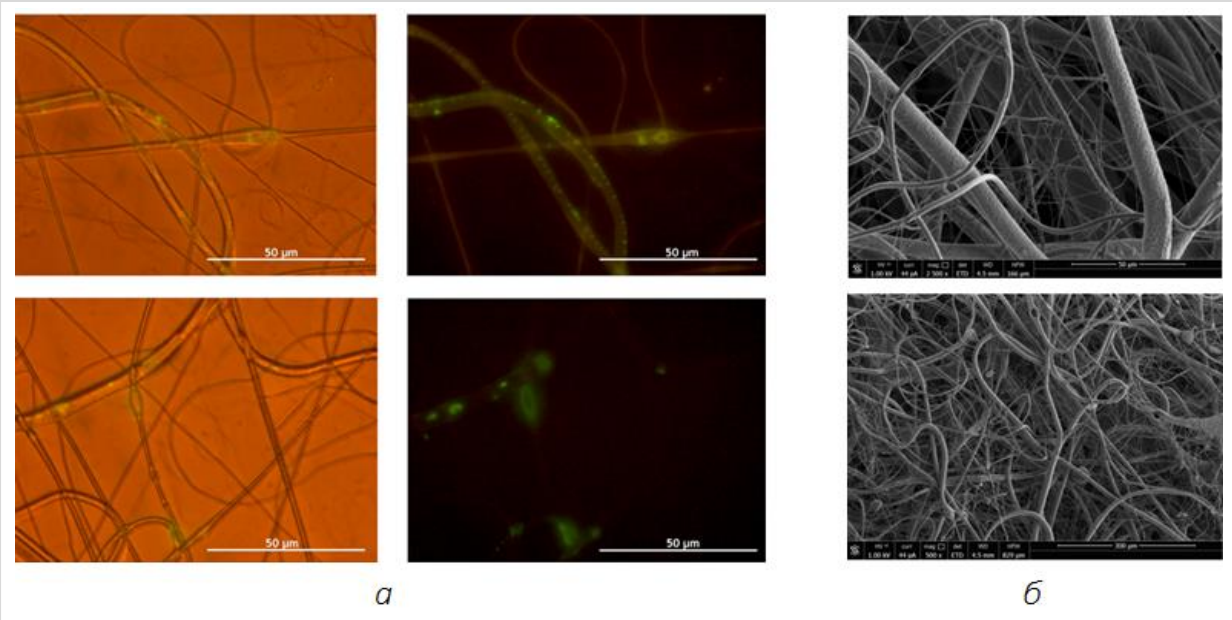


Рисунок 3.29 Микрофотографии: (а) волокна ПКЛ, содержащие флуоресцентную метку GFP; (б) морфология поверхности образцов волокнистого ПКЛ ($d_{ср}$=2,1 мкм)

Видно, что флуоресцентные метки размерами от 0,3 до 4 мкм введены в структуру полимерного волокна. Модифицированные материалы обладают широким диапазоном распределения волокон по диаметру. Средний диаметр волокон, рассчитанный из анализа микрофотографий волокнистых образцов на основе ПКЛ, составляет 2,1 мкм.

Отработанный на белковых факторах роста протокол в дальнейшем использовался для получения методом эмульсионного формования конструкций с включением препарата НВГ.

3.4.2. Физико-механические свойства образцов волокнистых материалов, модифицированных биологически активными соединениями

Механические испытания проводились на следующих по своему составу образцах: №1 – волокнистый ПКЛ с ПАВ (F-127) и БАС (EGF), растворенным в PBS; №2 – волокнистый ПКЛ с EGF, растворенным в PBS; №3 – волокнистый ПКЛ без модификации; №4 – каркас, модифицированный смесью EGF (4 пг) и НВГ (4 пг), содержащий в своем составе пленку из ПКЛ толщиной 0,025 мкм; №5 – каркас, состоящий из слоя волокнистого ПКЛ толщиной 0,3 мм, непроницаемого слоя пленки из ПКЛ толщиной 0,025 мм и слоя волокнистого ПКЛ толщиной 0,3 мм. Различия в составе образцов позволили установить влияние всех используемых в изготовлении модифицированных каркасов добавок. Полученные результаты представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 Характеристики модифицированных каркасов ТИК

№ п/п	Состав образца				Диаметр волокон, мкм	Пористость, %	Прочность, МПа	Относительное удлинение, %
	ПКЛ	F-127	БАС	Буфер				
1	+	+	+	+	4,2	89,6	2.1±0.5	55±6
2	+	-	+	+	4,3	90,2	3.6±0.3	341±77
3	+	-	-	-	4,0	89,8	6.6±0.2	249±92
4	+	+	+	+	4,3	~90	11,4±0.2	108±12
5	+	-	-	-	4,3	~90	12.0±0.2	119±13

Из таблицы видно, что внедрение БАС и плюроника F-127 существенно снижают механические свойства материала. Это можно объяснить тем, что капли воды, внедренные в структуру волокна, создают микродефекты, которые снижают прочность и относительное удлинение каркаса. Использование ПАВ позволяет улучшить диспергирование микрокапелек воды в объеме волокон, что вызывает, по всей видимости, увеличение количества дефектов в волокнах. Механические свойства конструкции и немодифицированного каркаса (образцы № 4 и №5) практически не отличаются друг от друга, поскольку механические свойства, в основном, определяются свойствами пленки. Полученные результаты показывают, что волокнистые слои из ПКЛ при модификации БАС уменьшают свою прочность на 60-70%, при этом механические свойства модифицированных каркасов могут

позволить длительное выполнение дренажной функции за счет заложенного в них запаса прочности.

Поверхностные свойства материала оказывают специфическое влияние на клеточную адгезию и пролиферацию [323]. Из литературы известно, что для волокнистого ПКЛ контактный угол смачивания составляет от 48.03±12.89° для обработанного плазмой ПКЛ [223] до 130° для упорядоченного волокнистого ПКЛ [200]. Для исследования поверхностных свойств модифицированных микроволокнистых каркасов были получены образцы волокнистых материалов, содержащие GFP и EGF, а также серии контрольных образцов для которых измерены краевые углы смачивания. Как видно из таблицы 3.10 физические параметры контрольных и модифицированных образцов в целом соответствуют друг другу.

Таблица 3.10 Характеристики изготовленных образцов по данным СЭМ

№	Содержание БАС на 1 мг образца	Средний диаметр волокна, мкм	Максимальный размер пор, мкм	Пористость материала, %	Толщина материала, мм
1	GFP/0,16 нг	~5,3	33	90	0,50
2	GFP/0,16 нг	~4,4	33	85	0,20
3	EGF/5,5 нг	~4,2	33	92	0,79
4	EGF/0,55 нг	~4,1	33	87	0,22
5	контроль (F-127)	~4,3	26	91	0,48
6	контроль	~4,0	33	81	0,10

Образец, не содержащий в своем составе ПАВ, имел выраженные гидрофобные свойства, причем краевой угол смачивания составил 145° (Рис. 3.30). В тоже время все образцы, модифицированные плюроником F-127, мгновенно поглощали каплю воды (краевой угол смачивания 0°), что ранее наблюдалось лишь для покрытых желатином нановолокон ПКЛ [312].

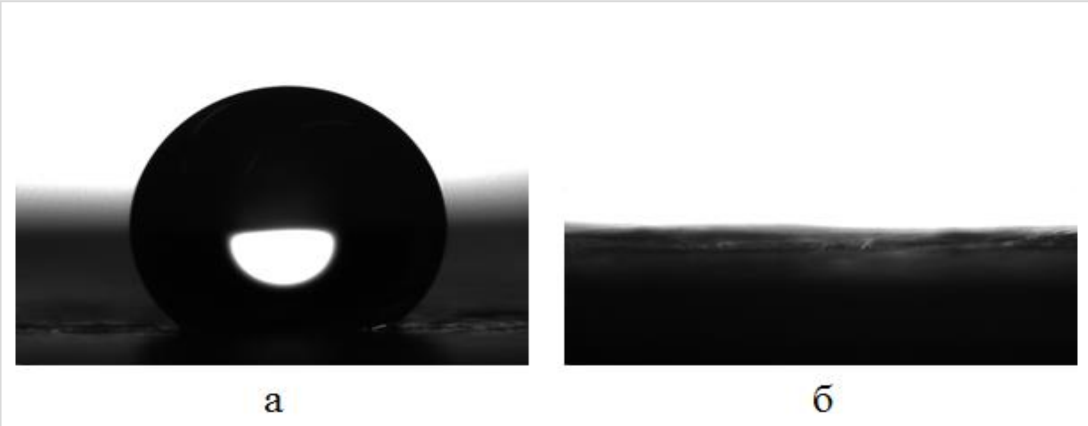


Рисунок 3.30 Визуализация краевого угла смачивания микроволокнистых каркасов на основе ПКЛ (а) без ПАВ и (б) с плюроником F-127. Световая микроскопия

Полученные результаты дают потенциальную возможность разработать каркас ТИК без барьерного слоя (пленки) за счет супергидрофобных свойств слоя нановолокнистого материала с низкой пористостью.

3.4.3. Измерение выхода фактора роста EGF из волокнистого материала *in vitro*

При получении волокнистых материалов измеренная методом ИФА концентрация EGF в пробах эмульсий БАС до проведения электроформования составила >4000 пг/мл, что подтвердило наличие БАС на стадии предподготовки эмульсии.

В литературе отмечается, что белок EGF стабилен, а его время полужизни составляет от 4 суток в физиологических жидкостях [184] до 30 суток в PBS [78] в зависимости от источника происхождения, pH среды и способа измерения. Проведенные исследования по экспозиции волокнистого материала с инкорпорированным БАС в среде PBS показали постепенное изменение концентрации EGF в инкубационной среде в течение 2-х месяцев, как показано на рисунке 3.31.

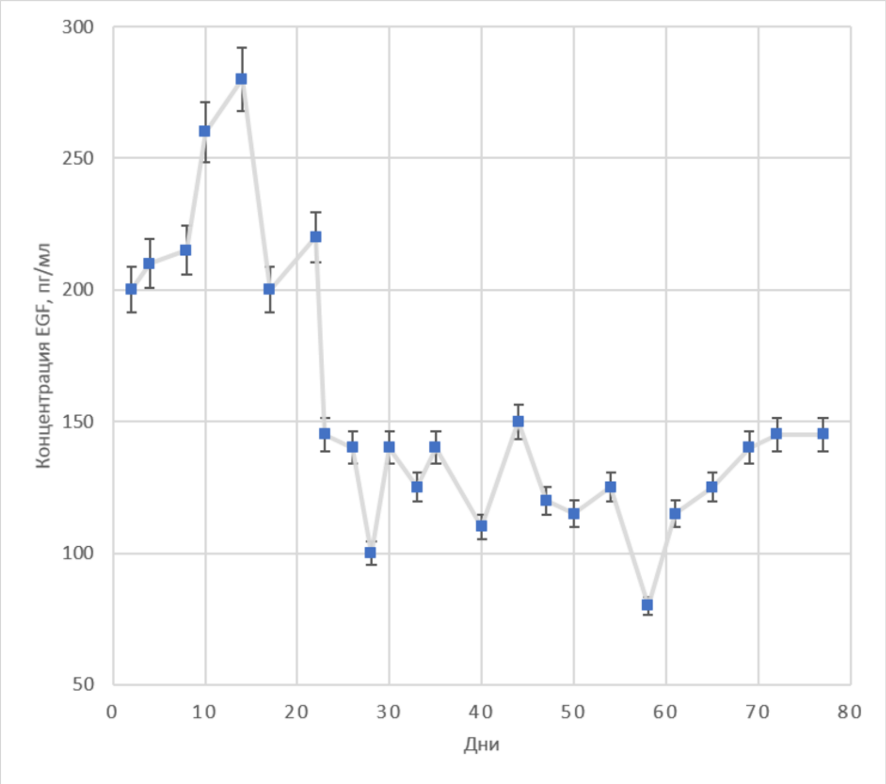


Рисунок 3.31 Динамика выхода EGF из волокнистого ПКЛ-каркаса при деградации. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение

Характер полученной кривой концентрации белка соответствует имеющимся данным научной литературы: выход на пиковый уровень за счет десорбции белка с поверхности материала, стабилизация и постепенное уменьшение детектируемой концентрации со временем [331], вызванное деградацией центров связывания белка. Следует отметить, что измеренные значения концентрации EGF в растворах (80-280 пг/мл) были более чем в 20-30 раз меньше предельных значений (>4000 пг/мл). Предположительно снижение концентраций EGF в среде DMEM относительно теоретически рассчитанного значения связано с медленной деградацией волокнистого материала на основе ПКЛ и, возможно, денатурацией EGF в результате воздействия факторов внешней среды [203].

3.4.4. Влияние волокнистого материала, модифицированного EGF, на пролиферацию клеток MCF-7

Биологический эффект полученных эмульсионным электроформованием с использованием EGF волокнистых материалов оценивался путем измерения

клеточного индекса – безразмерного коэффициента со значениями в диапазоне (0–700)×10^{-3}.

Измерение клеточного индекса проводилось следующим образом. В лунки 8-луночного Е-планшета высевали клетки MCF-7 в полной питательной среде, в первую фазу 0-17 часов происходила адгезия и пролиферация клеток, через 17 часов производилась замена полной питательной среды на среды без сыворотки (serum deprivation), и в лунки планшета добавлялись модифицированные и контрольные образцы волокнистых материалов. Изменения клеточного индекса проводили в промежутке 17-87 часов. Результаты измерений представлены на рисунке 3.32.

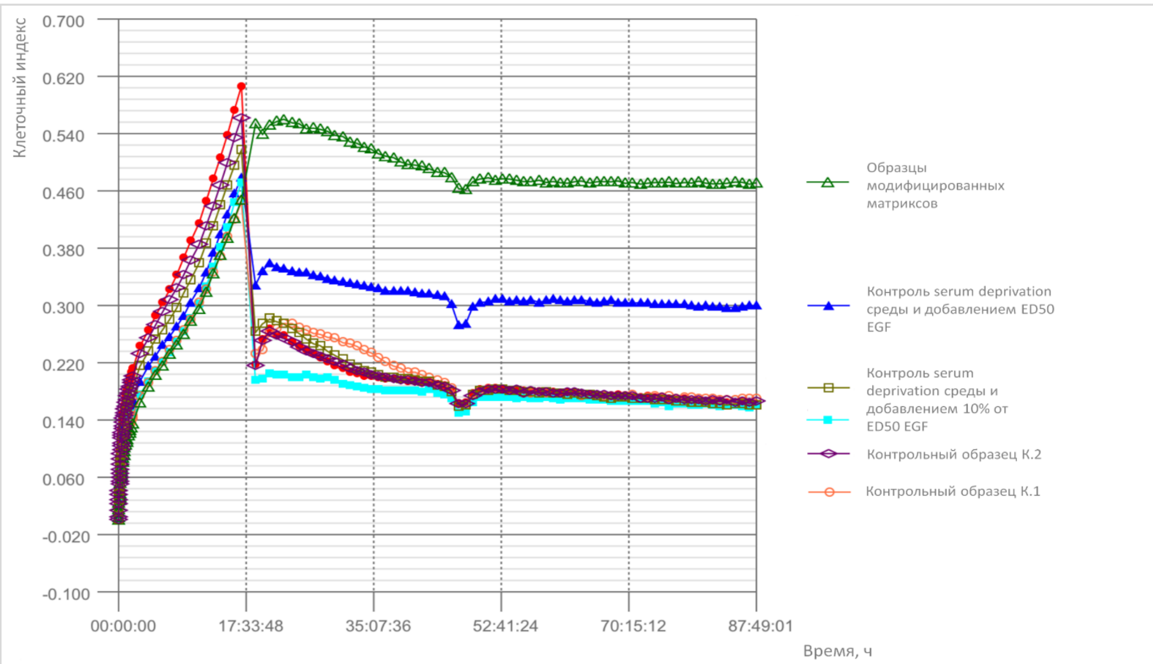


Рисунок 3.32 Динамика изменения клеточного индекса при культивировании эпителиальных клеток MCF-7 в клеточном анализаторе iCELLigence

В лунках с модифицированными EGF образцами был выявлен максимальный биологический эффект на пролиферацию клеток линии MCF-7 (средний клеточный индекс составил 0,465). В контрольных лунках стимулирования пролиферации не происходило, клеточный индекс уменьшался, что подтверждалось уменьшением площади клеток, контактирующих с поверхностью лунок (средний клеточный

индекс – 0,160). В лунках с добавлением EGF в концентрации ED50 наблюдали более низкие значения клеточного индекса по сравнению с лунками с образцами модифицированных EGF волокнистых материалов (средний клеточный индекс – 0,300). Таким образом, модифицированные с использованием EGF каркасы обладают, за счет выхода БАС из структуры волокнистого материала, эффектом стимуляции пролиферации культур эпителиальных клеток *in vitro*.

3.5. Резорбция образцов трубчатого каркаса в различных средах

Подбор состава конструкции для изготовления каркаса ТИК желчного протока связан с выбором материалов, помимо прочего, устойчивых к воздействию желчи в течение необходимого промежутка времени, а также удерживания продольной и поперечной нагрузок, возникающих при их имплантации.

Волокнистый материал из PLLGA за 14 суток, во всех исследованных средах полностью потерял свои прочностные свойства: его прочность уменьшилась на 66-89%, в зависимости от среды. Относительное удлинение изменилось не так значительно: в среде PBS оно выросло на 49%, в остальных средах наблюдалось его уменьшение на 11-50%. Молекулярная масса M_w уменьшилась на 13-45%, в зависимости от среды. Через 45 суток образцы полностью разрушились, уменьшение M_w составило 55,7-73,2%, а через 70 суток составило 72,5-83,8%. Произвести механические измерения образцов из PLLGA после 30 и 70 суток экспозиции не представлялось возможным, поскольку они потеряли свою целостность.

Волокнистый материал из ДАЦ за 20 суток незначительно изменил свои прочностные характеристики. Уменьшение прочности варьировало от 6 до 37%, а в реактиве Фентона прочность этого материала возросла на 29%. Относительное удлинение в желчи и DMEM+10%FBS уменьшилось на 17-20%, а в остальных средах возросло на 72-147%. Молекулярная масса M_w в среде DMEM+10%FBS и в реактиве Фентона увеличилась на 27-28%. После выдержки в других средах образцы стали не полностью растворимыми, что помешало измерить их молекулярную массу.

Волокнистый материал из ПКЛ за все время эксперимента (до 70 суток) во всех средах сохранил, в основном, свои прочностные характеристики. За время экспозиции молекулярная масса в наибольшей степени уменьшилась в среде желчи, на 27%.

Волокнистый материал из PLCL за 14 суток, находясь в среде желчи, не полностью сохранил свои прочностные характеристики, его прочность уменьшилась на 24%, однако эта потеря не привела к потере формы. Молекулярная масса уменьшилась за это время на 39%. За 56 суток этот полимер потерял свои прочностные свойства, его молекулярная масса уменьшилась на 70%.

Исследование композитных конструкций на основе ПКЛ со вторым и третьим слоем из PLLGA при сравнении величин потери массы выявило, что при использовании в качестве второго слоя пленки потеря массы составляет 0,77%, а в случае проклеенных волокон – 19,3%. В обоих случаях практически полностью отсутствует наружный слой.

Исследование композитных конструкций на основе “ПКЛ+PLDGA” показало, что фрагментировалась значительная часть третьего, наружного слоя. В случае композитных конструкций на основе “ПКЛ+ДАЦ” образец сохранил форму, наружный слой цел, хотя немного распушился, образец потерял в весе 3,5%.

Выявлена значительная разница в кинетике деградации плоских образцов и трубчатых каркасов, в особенности это важно для ПКЛ, который используется для внутреннего слоя каркаса, непосредственно контактирующего с желчью. На это, в определенной мере, указывает то, что наименьшей резорбции подвергся внутренний слой из ПКЛ, находившийся в образце “ПКЛ+PLLGA”. Обнаружено, что образцы, имеющие в своем составе непроницаемый слой из пленки, подверглись более значительной деформации, по сравнению с образцами, в которых этот слой изготовлен из проклеенных волокон. Это может объясняться тем, что в структуре пленки могло остаться большее количество исходного растворителя.

3.6. Изучение активности прорастания сосудов в волокнистый поликапролактон, модифицированный препаратом “Неоваскулген”, при имплантации крысам в хроническом эксперименте

С целью оценки эффективности ангиогенной модификации волокнистого материала из ПКЛ было проведено экспериментальное исследование по подкожной имплантации крысам образцов материала, модифицированного генотерапевтическим препаратом «Неоваскулген». Использование ПКЛ в качестве материала-носителя обуславливалось физико-химическими особенностями его биорезорбции. Забор аутопсийного материала осуществлялся через 7, 16, 33, 46 и 64 суток после субфасциальной имплантации лабораторным крысам. Проведено гистологическое исследование биологических образцов, представлявших собой тканевые лоскуты с частично деградировавшим имплантированным каркасом. Изменения в образцах по различным срокам представлены на рисунках 3.33-3.35.

Материал на 7-е сутки после имплантации описывался только качественно (без подсчета сосудов) ввиду слаборазвитой ткани вокруг сохранных волокон имплантированной конструкции. Около 80% каркаса не фрагментировано, сосуды, в основном, находятся на периферии сохранного каркаса (Рис. 3.33). Обозначения: М – пунктирной линией отмечена зона нерезорбированного материала, ЗР – зона резорбции материала.

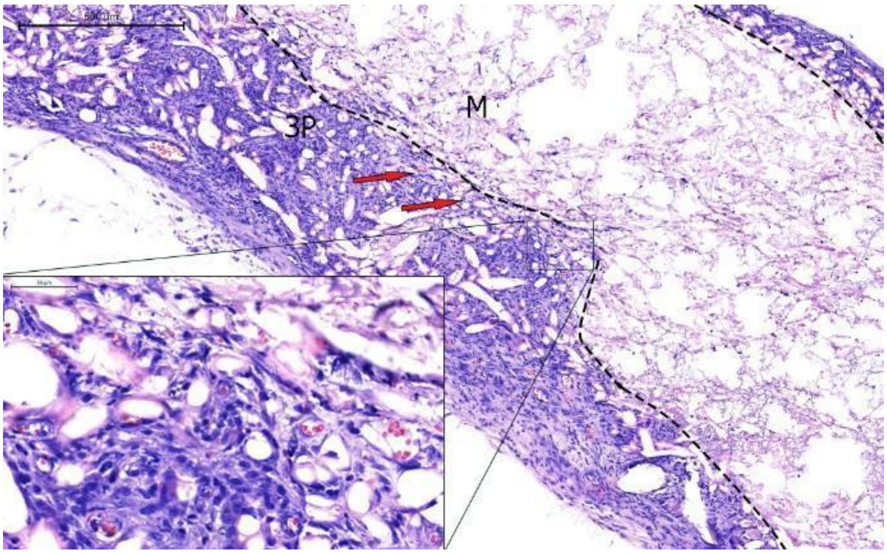


Рисунок 3.33 Гистологический препарат участка имплантации ПКЛ-каркаса (НКп, 7-е сутки имплантации). Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×50. На увеличенном участке видна инфильтрация макрофагами и новообразованные сосуды (красные стрелки), окраска гематоксилином-эозином, увеличение ×400

На 16-е сутки после имплантации среди грануляционной ткани, формирующейся в зоне резорбции каркаса, сформировалась сеть сосудов капиллярного типа (Рис. 3.34).

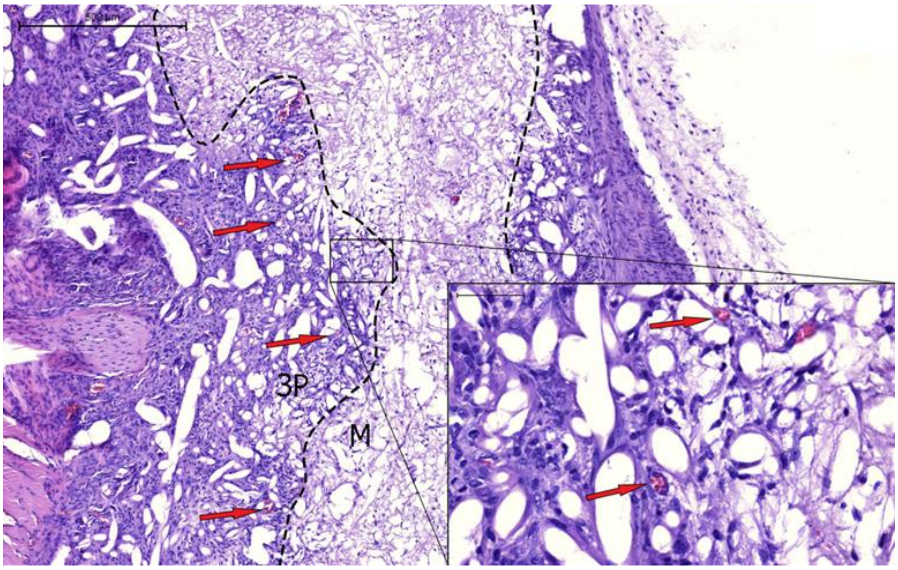


Рисунок 3.34 Гистологический препарат участка имплантации ПКЛ-каркаса (НКп, 16-е сутки имплантации). Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение ×50-400

На 33-и сутки после имплантации наряду с капиллярами появились сосуды более крупного калибра (Рис. 3.35). Формирующаяся к этому сроку зрелая грануляционная ткань вокруг волокон материала со временем (на сроках 46 и 64 суток после имплантации) превращается в организованную соединительную ткань. Отмечались различия в материалах с различными концентрациями препарата НВГ и контрольных образцах. На рисунке 3.35б (контроль) видны ГМКИТ, которые окружают области имплантированного материала, оставшиеся после растворения полимерных волокон при пробоподготовке. Из рисунка 3.35в (ВКп) видно, что ткань содержит толстые коллагеновые волокна, инфильтрацию клетками воспаления, а также полнокровные сосуды разного калибра и ГМКИТ.

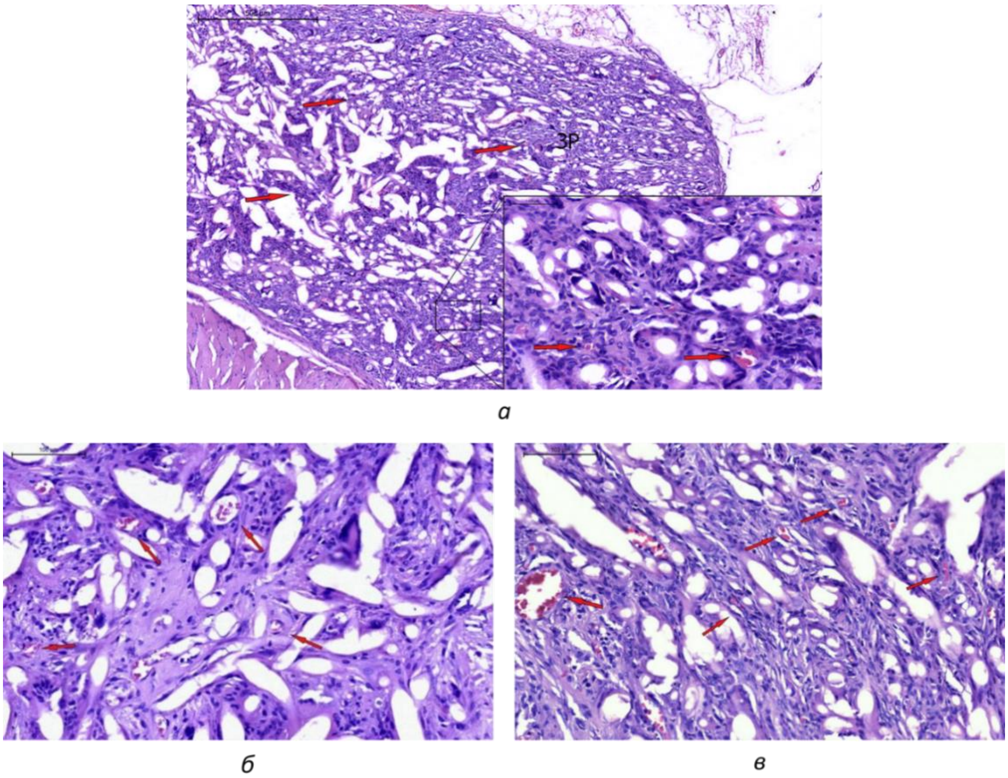


Рисунок 3.35 Гистологический препарат участка имплантации ПКЛ-каркаса, 33-и сутки после имплантации. Окраска гематоксилином-эозином. Красными стрелками показаны сосуды: а) НКп, большая часть ткани представлена зоной резорбции материала. Масштабная шкала – 500 мкм. Увеличение ×50-400. б) Контроль. Масштабная шкала – 100 мкм. Увеличение ×200. в) ВКп. Масштабная шкала – 100 мкм. Увеличение ×200

В эксплантированных образцах со временем отмечалось постепенное уменьшение видимого материала вследствие его фрагментации и резорбции в зонах сосудистого роста. Обработка снимков показала динамику уменьшения со временем характерных размеров зон имплантированного материала в образцах (Рис. 3.36). При этом изменение размеров зоны материала в образцах с ВКп было достоверно меньше, чем у образцов с НКп (p<0,0001). Контрольные образцы показывали слабую динамику изменения размеров зоны материала, возможно за счет отсутствия модификации волокнистого материала.

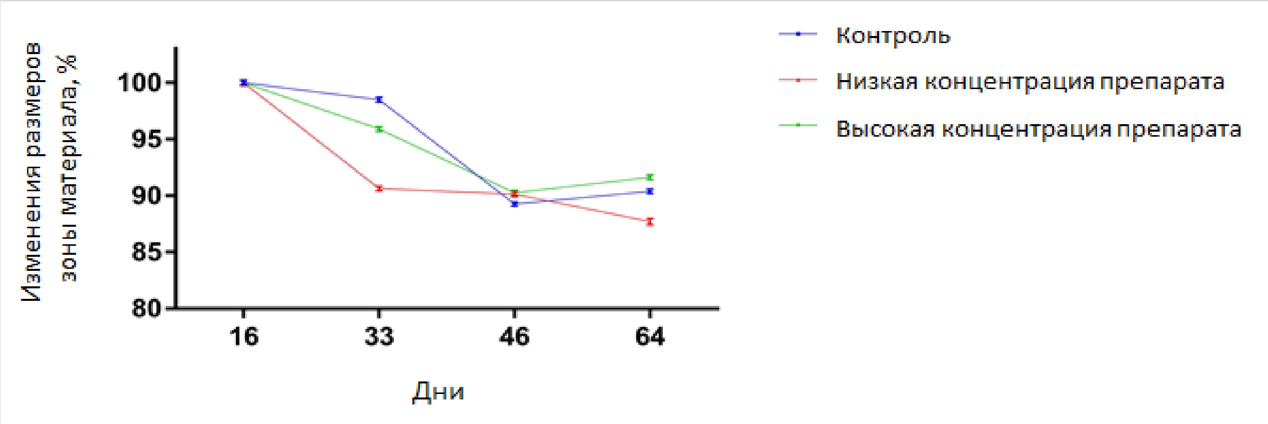


Рисунок 3.36 Динамика изменения характерных линейных размеров областей материала в образцах

В образцах на 46-е и 64-е сутки после имплантации каркас из ПКЛ (первоначальный диаметр волокон составлял 4-5 мкм) практически полностью фрагментирован прослойками новообразованных тканей и не выявлялся при визуальном осмотре.

Изучение плотности распределения сосудов в образцах выявило различия в уровнях васкуляризации на различных сроках экспозиции. В таблице 3.11 представлены данные о плотности распределения сосудов при имплантации ПКЛ-каркасов без витализации, а также каркасов, витализированных различными концентрациями препарата НВГ.

Таблица 3.11 Плотность распределения сосудов в контроле и группах сравнения (n/мм^2)

Группа сравнения	Среднее ± стандартное отклонение
16-е сутки после имплантации	
Контроль	30,65 ± 2,49
Низкая концентрация НВГ	33,09 ± 1,07
Высокая концентрация НВГ	34,58 ± 2,29
33-и сутки после имплантации	
Контроль	21,81 ± 5,23
Низкая концентрация НВГ	22,78 ± 4,04
Высокая концентрация НВГ	31,17 ± 5,25
46-е сутки после имплантации	
Контроль	40,71 ± 9,92
Низкая концентрация НВГ	41,66 ± 14,51
Высокая концентрация НВГ	43,45 ± 7,80
64-е сутки после имплантации	
Контроль	41,26 ± 6,13
Низкая концентрация НВГ	37,73 ± 4,28
Высокая концентрация НВГ	41,76 ± 0,12

На 16-е сутки отмечено увеличение плотности сосудов в группах с высокой и низкой концентрацией НВГ по сравнению с контролем (на 13% в группе ВКп, $p < 0,05$), что по всей видимости объясняется выходом БАС из объема полимерного волокна. Поскольку БАС содержались в эмульсионных каплях в структуре полимера, то их выход носил отложенный характер в зависимости от свойств и геометрии поверхности.

На 33-и сутки отмечено уменьшение общей плотности сосудов в контрольной группе вследствие смены этапа васкулогенеза (капилляры диаметром менее 15 мкм) на нормальный ангиогенез, однако, на этом фоне в группе ВКп количество сосудов на 43% ($p < 0,001$) превысило значения в контроле, что по всей видимости объясняется выходом препарата НВГ и стимулированием терапевтического роста сосудов. В образцах на 46-е и 64-е сутки после имплантации различий в плотности распределения сосудов в образцах по сравнению с контролем выявлено не было (Рис. 3.37А).

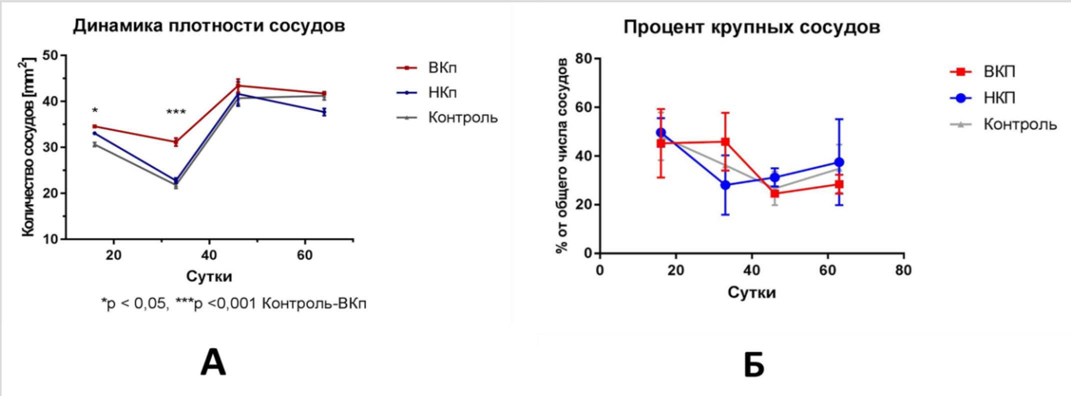


Рисунок 3.37 Показатели роста сосудов на 16, 33, 46 и 64 сутки: А) плотность распределения сосудов, мм$^{-2}$; Б) относительное содержание крупных сосудов. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего

Относительное содержание крупных сосудов было схоже в контрольной группе и группах сравнения, при этом на 33-и сутки после имплантации наблюдались максимальные различия в группах высокой и низкой концентрации препарата НВГ (Рис. 3.37Б). Известно, что новообразованные соматические капилляры (васкулогенез) имеют диаметр до 10-15 мкм, а дальнейшее их развитие во зрелые сосуды (ангиогенез) регулируются множеством цитокинов, ростовых факторов, а также характером взаимодействия эндотелиальных клеток друг с другом, с компонентами ВКМ и с клетками микроокружения [78]. Лишь спустя некоторое время происходит образование зрелых сосудов, схлопывание микрососудов и таким образом – общее уменьшение локальной плотности сосудов. Это же мы наблюдали при изучении морфологии препаратов в контроле – в период с 16-х до 64-х суток наблюдалось изменение процентного соотношения сосудов большого калибра диаметром более 15 мкм. Динамика изменения морфологии образцов эксплантированного материала представлена на рисунке 3.38.

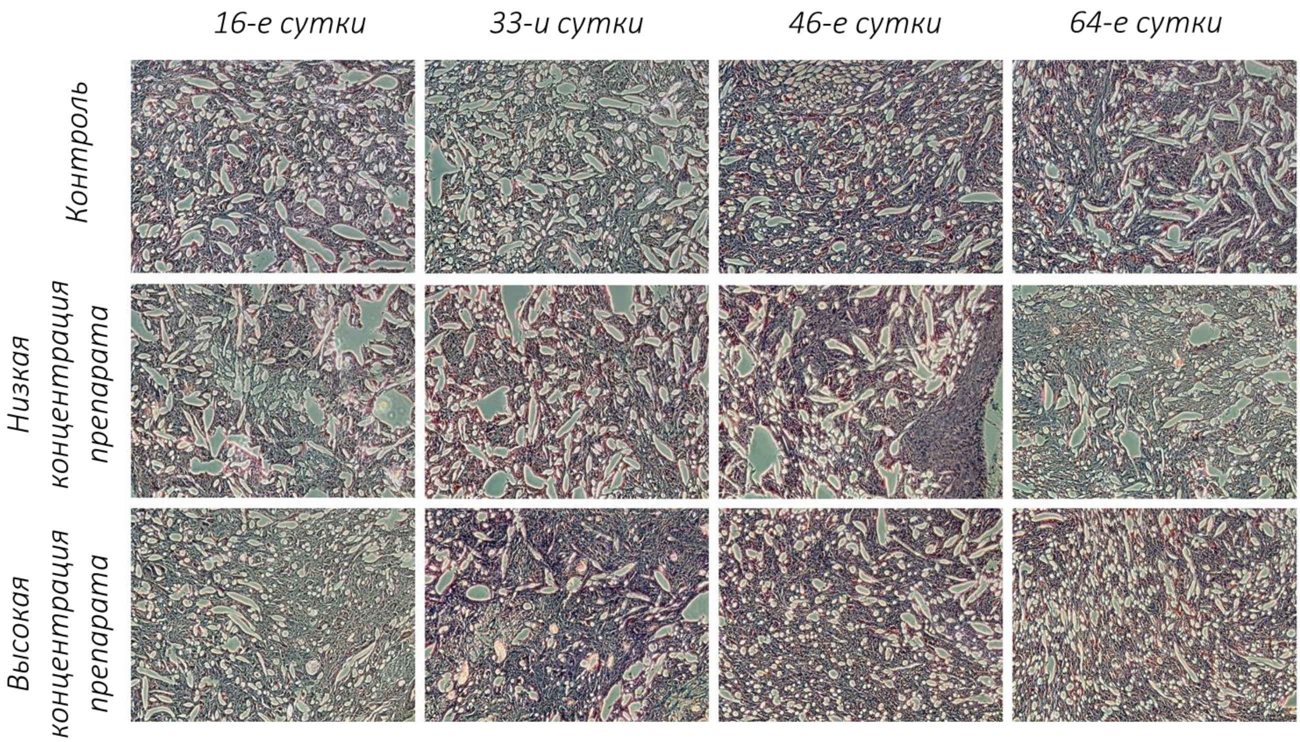


Рисунок 3.38 Гистологические препараты участков имплантации ПКЛ-каркаса на сроки 16, 33, 46 и 64 суток. Фазовый контраст. Увеличение ×100

3.7. Оценка эффективности витализации многослойного каркаса ТИК клеточными культурами

3.7.1. Эпителиальные клетки желчного протока

Решение задачи по успешной регенерации желчного протока невозможно без получения культуры клеток, выстилающих внутри- и внепеченочные желчные протоки – холангиоцитов. На рисунке 3.39 представлены микрофотографии культуры холангиоцитов, полученной от здорового донора.

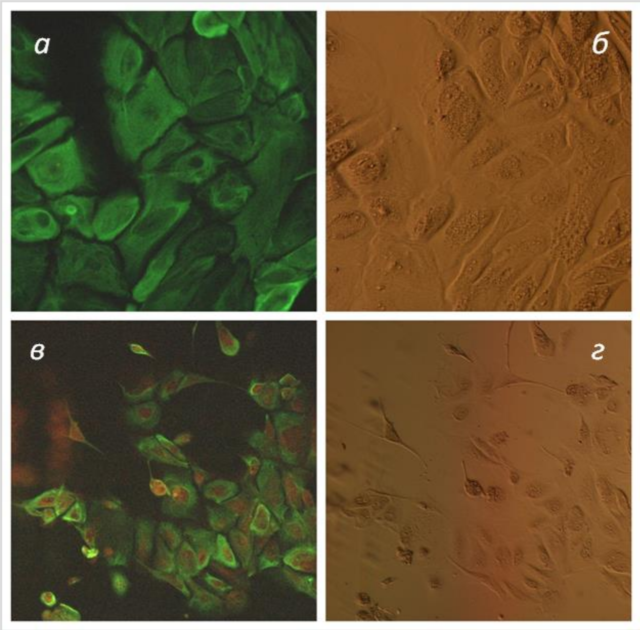


Рисунок 3.39 Культура холангиоцитов, полученная от здорового донора: а – иммунофлуоресцентная окраска на CK19 (зеленые); б – световая микроскопия. Увеличение ×200; в – окраска на CK19 (зеленые), ядра окрашены бромистым этидием (оранжевые); г – световая микроскопия. Увеличение ×100

3.7.2. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга

ММСК КМ представляют собой малодифференцированные клетки, которые как правило характеризуются специфической экспрессией поверхностных маркеров (экспрессия CD29, CD73, CD90, CD105, и обязательное отсутствие CD34, CD45, CD79/CD19, HLA-DR), и способностью к самообновлению [38]. Выбор ММСК КМ как одной из клеточных культур, используемых для заселения многослойного каркаса, был обусловлен их способностью к дифференцировке в разные типы клеток соединительной ткани [38]. Регенеративный потенциал ММСК КМ при их трансплантации *in vivo* был показан в ряде экспериментальных [36, 37, 192] и клинических работ [248, 252]. На рисунке 3.40 представлены различные этапы получения клеточной культуры ММСК КМ.

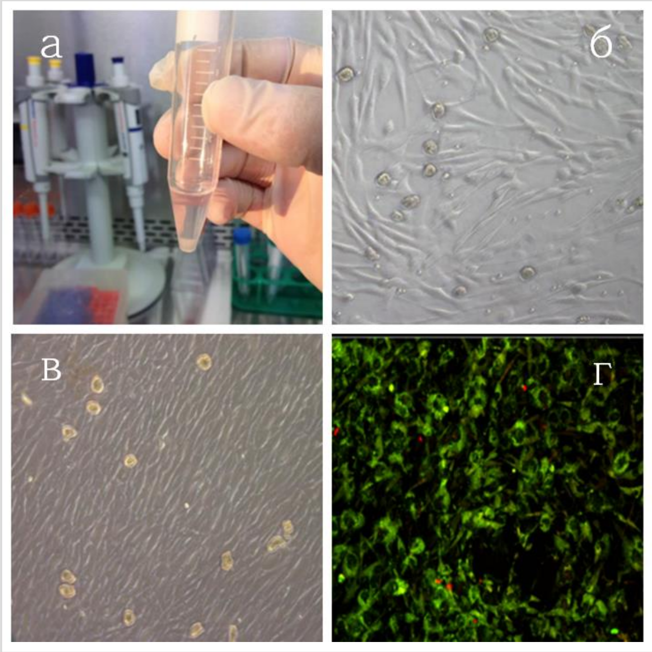


Рисунок 3.40 ММСК КМ: а) Суспензия клеток после центрифугирования; б) Первичная культура, 7 сут. культивирования. Ув. ×200, фазовый контраст; в) Монослой клеточной культуры на 3-ем пассаже. Ув. ×200, фазовый контраст; г) Клеточная культура 4-го пассажа, 21 сут. культивирования на коллагеновой мембране. Конфокальная микроскопия. Окраска: кальцеин АМ и этидиум гомодимер-1

Важной особенностью ММСК КМ является иммуносупрессивное воздействие на Т- и В- клетки и NK-клетки, которое может быть использовано для снижения воспалительной реакции на компоненты имплантируемой ТИК [38,342].

3.7.3. Двухслойное заселение волокнистых каркасов ТИК клеточными культурами

Проведено заселение созданных композитных трехслойных каркасов из модифицированных БАС материалов клеточными культурами ММСК КМ и ЭКЖП. Выполнено заселение поверхностей разработанной конструкции клетками: для заселения внутренней поверхности из волокнистого ПКЛ, модифицированного EGF, использовались ЭКЖП, а для заселения наружной поверхности из волокнистого ПДЛГА, модифицированного НВГ, использовались ММСК КМ. Заселение клеток осуществлялось в соответствии с разработанными режимами тканевого (ЭКЖП) и динамического (ММСК КМ) культивирования. На рисунке

3.41 представлена полученная по результатам заселения клеточными культурами многослойная ТИК желчного протока, готовая для имплантации в качестве сегмента общего желчного протока.

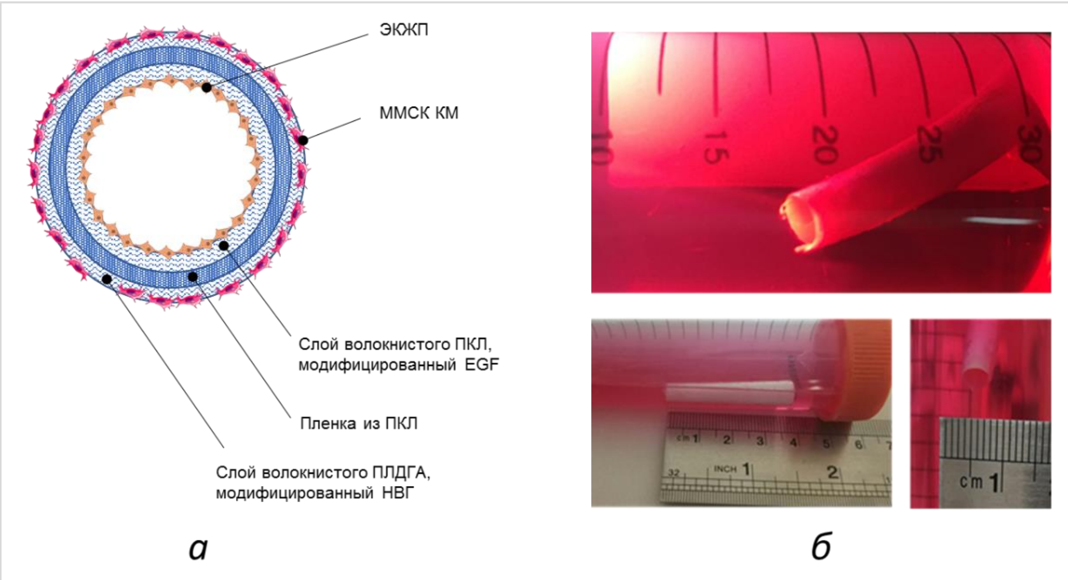


Рисунок 3.41 Полученная многослойная ТИК желчного протока: а – общая схема трехслойного каркаса и двухслойного клеточного покрытия; б – образец ТИК желчного протока в полной питательной среде

Конструкцию с внешней стороны заселяли ММСК КМ в соответствии с разработанным ранее режимом динамического культивирования. Монослой живых клеток ММСК КМ на поверхности волокнистого ПДЛГА представлен на рисунке 3.42. Оценка жизнеспособности клеток методом конфокальной микроскопии с окраской клеток LIVE/DEAD показала варьирование показателя в пределах 86-94%.

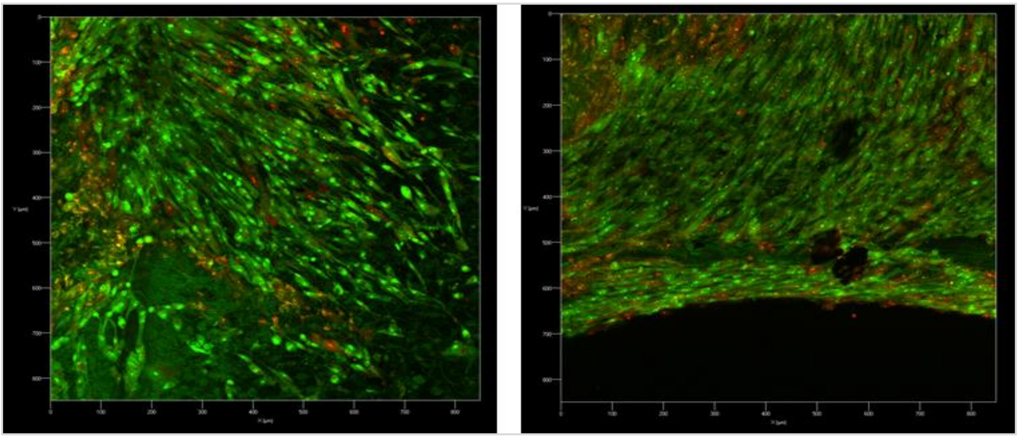


Рисунок 3.42 Монослой живых клеток ММСК КМ на поверхности волокнистого ПДЛГА. Конфокальная микроскопия. Окраска: кальцеин АМ и этидиум гомодимер-1. Увеличение ×40

Результаты флуоресцентной микроскопии внутренней поверхности конструкции из волокнистого ПКЛ, заселенного ЭКЖП, представлены на рисунке 3.43.

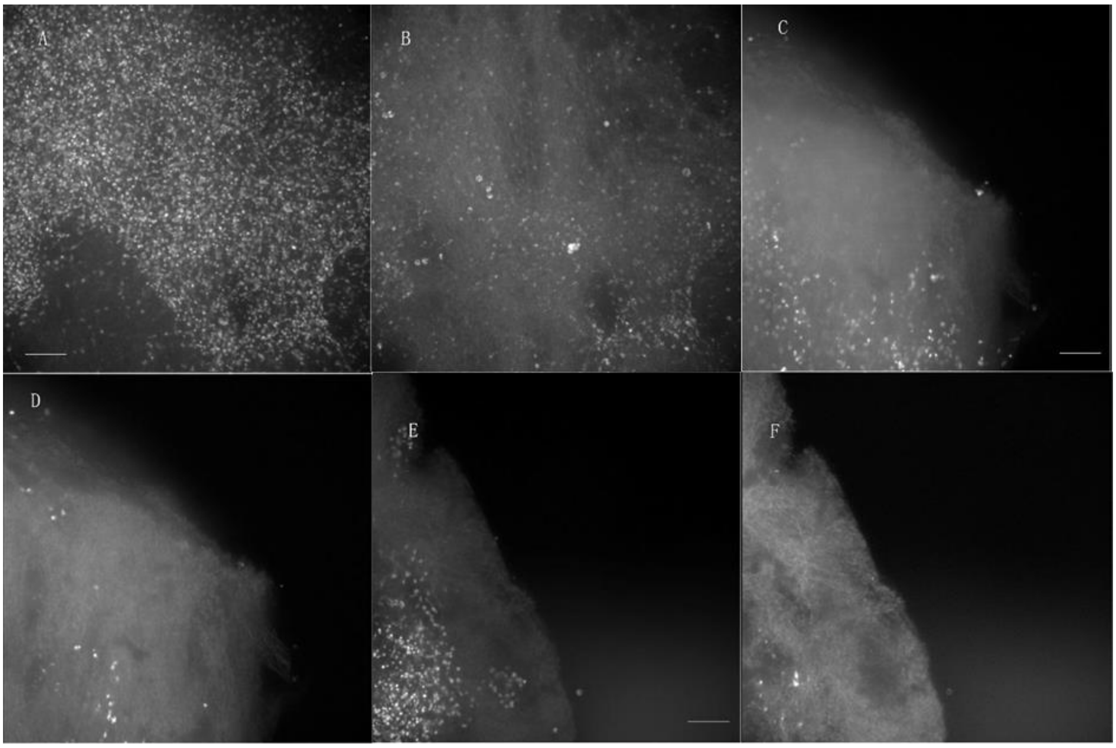


Рисунок 3.43 Слой волокнистого ПКЛ, заселенный ЭКЖП человека. ThermoScientific™ CellInsight™ CX7, совмещение в Z-проекции 10-ти изображений с шагом 10 мкм, шкала 100 мкм. Изображения: A, C, E – окраска Hoechst 33342, 385нм; B, D, F – нет окраски, 485 нм. Объектив ×4

Различимы ДНК-содержащие фрагменты клеточных ядер, окрашенные флуорохромом Hoechst 33342. Эпителиальные клетки мигрировали вглубь волокнистой конструкции, сохранив жизнеспособность. Сравнительно короткие сроки тканевого культивирования (96 часов) не позволили получить конфлюэнтный слой на внутренней поверхности конструкции.

Заключение по Главе 3

Разработаны и обоснованы требования к дизайну многослойной и многокомпонентной ТИК желчного протока. Составляющие компоненты ТИК исследованы в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Получены образцы каркаса из волокнистого ПКЛ, модифицированного генотерапевтическим препаратом “Неоваскулген” методом эмульсионного электроформования. Показано статистически значимое увеличение плотности распределения сосудов в месте имплантации модифицированных каркасов. Отмечено увеличение плотности распределения сосудов на 43% при биорезорбции материала каркасов. Результаты согласуются с данными других авторов, которые продемонстрировали возможность использования БАС – двухцепочечных ДНК-плазмид как альтернативы белковым факторам, без выраженного цитотоксического эффекта. Выявлен дозозависимый эффект на васкуляризацию и ангиогенез при увеличении концентрации препарата “Неоваскулген” в материале. При этом эффект является обратимым, и при прекращении выхода препарата из резорбированного каркаса плотность распределения сосудов приближается к значениям в контроле. Результаты продемонстрировали эффективность ангиогенной витализации каркасов на основе биосовместимых и биодеградируемых материалов для обеспечения физиологической и биологической совместимости трансплантатов. Проведено заселение многослойного композитного каркаса ММСК КМ (с жизнеспособностью клеток 86-94%) и ЭКЖП. Создан образец многослойной витализированной ТИК, при этом ММСК КМ образовали конфлюэнтный слой в составе такой конструкции.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Достаточность использованных в работе материалов и методов для решения поставленных задач

Проблеме поиска подходящих материалов для реконструкции и восстановления желчных путей после травматических повреждений посвящено большое число выдающихся работ в области гепатобилиарной хирургии [12, 28]. Использование ТИК для восстановления повреждений желчных протоков представляет новейшую область современной экспериментальной медицины, однако внедрение данных технологий в клиническую практику требует всестороннего изучения патофизиологических процессов, сопровождающих как травму, так и реабилитацию после реконструктивной или восстановительной операции. Иными словами, создание физиологически совместимой ТИК желчного протока для использования в клинической медицине требует системного понимания *патофизиологической сущности восстановительной операции* (Н.И. Пирогов, 1852; цит. по [34]). Проведенные ранее выдающиеся изыскания пионеров гепатобилиарной хирургии заложили основу существующих подходов по реконструкции патологически измененных или поврежденных желчных путей [59,212,253].

В настоящее время созданием биоинженерного желчного протока или его компонентов в мире занимается несколько ведущих научных групп, прежде всего M. Miyazawa и M. Aikawa (Университет Тейкио, Япония), а также R. Huebert и N. Jalan-Sakrikar (Mayo Clinic, г. Рочестер, США). Создание ТИК желчного протока представляет высокий научно-практический интерес вследствие наличия общих проблем при терапии патологически измененных эпителиальных органов и нерешенной на сегодняшний день клинической проблемы лечения пациентов с травматическими повреждениями желчных протоков.

Известны работы ведущих научных коллективов по получению каркасов для использования в эксперименте или создания *in vitro* моделей желчного протока, в которых были продемонстрированы отдельные подходы по созданию функциональных эквивалентов желчного протока или его компонентов. Например, научная группа под руководством M. Miyazawa and M. Aikawa (2010) из Университета Тейкио (Япония) разработала каркас ТИК желчного протока, представлявшего собой заплату желчного протока размерами 20 мм × 10 мм на основе волокнистого PLCL (50:50). В эксперименте на свиньях было показано заселение каркаса слоем $CK19^+$ клеток, т.е. наблюдалась эпителизация синтетической конструкции холангиоцитами без модификации материала [69]. Однако отсутствуют долгосрочные результаты выполненных экспериментальных операций с использованием данного каркаса. R. Huebert и N. Jalan-Sakrikar (2015) из Mayo Clinic (г. Рочестер, США) создали органоиды эпителиальной стенки желчного протока, предназначенные для модификации биосовместимых покрытий и биопечати с целью получения полностью функциональных и витализированных каркасов [81]. Однако в данной работе не была решена проблема обеспечения достаточных механических характеристик конструкций, которые было бы возможно формировать на основе билиарных органоидов. Q. Li (2012) из Медицинской школы Нанкинского университета использовал коллагеновый каркас, модифицированный bFGF, в качестве заплаты для замещения сегментарных дефектов желчного протока [235]. Однако высокая пластичность коллагена и невысокие механические характеристики не позволяли использовать его в качестве каркаса, устойчивого к механическому сдавливанию. Научная группа из Чжэцзянского университета под руководством проф. Zong (2017) разработала цитосовместимый двухслойный ПКЛ/ПДЛГА каркас для заселения ММСК КМ и последующей имплантации свиньям [395]. Однако, данный подход не предполагал модификацию материала каркаса с использованием БАС.

В настоящей работе при изучении биодеградации волокон с белком EGF были проведены работы на клеточных культурах, которые показали изменения клеточной пролиферации в среде деградирующего волокнистого ПКЛ-материала с

инкорпорированными факторами роста. При этом оценки влияния деградирующего волокнистого ПКЛ-материала с инкорпорированным препаратом НВГ на различные клеточные культуры с целью выявления клеток, наиболее чувствительных к составу среды деградирующего материала, проведено не было. Однако результаты таких исследований, без учета физиологического влияния на ангиогенез сложнокомпонентных продуктов гидролиза полимерного материала, образующих в том числе ДНК-конъюгаты [209], не позволили бы однозначно связать результаты *in vitro* и *in vivo*. Например, в работе Sung et al. (2004) отмечался физиологический эффект ингибирования ангиогенеза *in vivo* (количество сосудов снижалось в 1,5-3 раза) при имплантации материала из быстро деградирующего PLGA по сравнению с материалом из ПКЛ [353], что подтверждает необходимость рассмотрения ангиогенного эффекта продуктов биодеградации модифицированных НВГ волокон как комбинации компонентов разнонаправленного воздействия. Механизмы связывания *in vivo* белковых и нуклеиновокислотных молекул с продуктами биодеградации также могут оказывать ингибирующий эффект на процессы ангиогенеза при имплантации модифицированных материалов.

Современные методы патологической физиологии все более основаны на инженерном подходе к постановке и решению задач с использованием инструментария системной биологии в качестве ключевого метода анализа и интерпретации данных [197, 224]. Использованные в настоящей работе методы позволили обеспечить биосовместимость, биодеградацию и функциональную многослойность создаваемой ТИК с сохранением достаточной механической прочности, а метод хирургического эксперимента позволил оценить физиологический эффект при имплантации. Таким образом, использованный в работе инструментарий был достаточным для решения поставленных научных задач в соответствии с научной специальностью.

4.2. Систематизация результатов реконструктивных и восстановительных операций на желчных путях

Детальный анализ краткосрочных и долгосрочных осложнений, возникающих при реконструкции общего желчного протока, необходим с целью разработки дизайна ТИК желчного протока, использование которой позволит избежать возникновения рассматриваемых послеоперационных осложнений. Первой попыткой обобщения накопленного опыта использования различных материалов для реконструкции желчных путей была работа Jacobson (1914), в которой сопоставлялись единичные исходы и успешность выполнения реконструктивных операций [199]. В дальнейшем связанные с проблемой реконструктивных и восстановительных операций на желчных путях систематические обзоры выполнялись врачами-хирургами и имели преимущественно прикладную клиническую направленность.

Патофизиологическая сущность операций по восстановлению травм общего желчного протока требует учета анатомических и физиологических особенностей органа [23] для обеспечения нормального исхода операций в кратко-, средне- и особенно в долгосрочном периоде [40]. Это означает, что компоновка создаваемых ТИК должна исключать развитие как ранних, так и поздних послеоперационных осложнений. В последнее время все больше исследователей высказывается в пользу применения мультидисциплинарного подхода для анализа причин развития осложнений и поиска новых методов лечения [41, 316, 362], включая изучение биологических механизмов [71, 80].

Сбор и систематизация подробных сведений, особенно ценных для оценки поздних послеоперационных осложнений, и сегодня выполняется лишь отдельными энтузиастами. Например, в клинике факультетской хирургии им. С.П. Федорова Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова по инициативе проф. В.М. Ситенко была создана уникальная система наблюдения за больными, перенесшими операцию на желчных путях и язвенной болезни, содержащая в картотеке-архиве сведения о более чем 500 оперированных на желчных путях за многие годы наблюдения [47, 57]. Также исключительный интерес представляет

работа Э.И. Гальперина и Н.В. Волковой (1988) в которой были обособлены и систематизированы результаты повторных операций на желчных путях [11]. В литературе отмечается целесообразность выполнения подобного многофакторного анализа при обобщении долговременных исходов операций [41,340].

За рубежом одной из последних исключительных работ является собранная компанией IBM для системы поддержки принятия врачебных решений на основе искусственного интеллекта IBM Watson база данных Truven Marketscan, в которую вошли 554 806 случая холецистэктомии в период 2011-2014 гг., в том числе 319 184 случая с результатами послеоперационного наблюдения в течение не менее 1-го года, из которых 741 приходились на пациентов, перенесших интраоперационную травму общего желчного протока (0,23% от общего числа операций) [92]. Крупнейшая общенациональная база данных по лапароскопической холецистэктомии GallRiks (Швеция) содержит сведения по 50 000 пациентам, в том числе по 150 пациентам с интраоперационной травмой [92,309]. Однако описания в таких базах раскрывают исключительно клинические аспекты патофизиологических процессов, сопровождающих послеоперационные состояния желчных путей. При этом более детальное биологическое описание таких процессов помогло бы выявить больше ассоциированных с патологическими состояниями факторов и способствовать созданию оригинальных физиологически релевантных моделей заболеваний. Собранная в рамках настоящей работы панорамная база данных позволяет расширить взгляд на патофизиологию осложнений реконструктивных и восстановительных операций на желчных путях.

4.3. Свойства материалов каркаса ТИК желчного протока

Используемые в гепатобилиарной хирургии баллонная дилатация и пластиковые стенты недостаточно эффективны ввиду частой их миграции из просвета протоков, необходимости реинтервенции каждые 3 месяца из-за обтурации просвета стента солями желчных кислот, а также из-за возможных осложнений при их повторной установке [149]. Различными авторами указывается, что создание имплантируемых синтетических изделий требует комплексного

подхода, включающего использование клеточных технологий, природных и синтетических материалов, БАС при разработке ТИК, которые бы приблизили физиологические характеристики трансплантата к нормальному функционалу интактного органа [8, 84]. Решению этих вопросов посвящены многочисленные *in vitro* и *in vivo* исследования материалов, главным образом, сополимеров молочной кислоты [257, 357]. Оптимальное время стентирования для достижения положительного результата при стриктурах желчных протоков у больных окончательно не определено, фигурируют сроки в пределах от 3-х до 9-ти месяцев [210].

Резорбция полимеров *in vivo* происходит быстрее, чем *in vitro* благодаря воздействию метаболитов организма, а также вследствие иммунологической реакции на трансплантат [29]. Основными механизмами биодеградации образцов из полимерных материалов в организме являются гидролиз содержащихся в них сложноэфирных групп и окислительная деградация продуктами активных форм кислорода. В процессе гидролиза полимерные цепи полиэфиров разрушаются, вследствие чего снижаются механические свойства каркасов и постепенно возрастают потери массы. Присутствие микроорганизмов или эукариотических клеток существенно влияет на скорость изменения молекулярной массы полиэфиров. Автокаталитический характер деградации обуславливается локальным накоплением кислот, выделяющихся при разрушении полиэфиров, и наблюдается как *in vitro*, так и *in vivo* [162, 244]. Так, в водных средах происходит разрыв сложноэфирных связей полимерного материала по всему объему волокна, в результате чего молекулярная масса и механические свойства образцов снижаются. Скорость гидролиза образцов в воде может зависеть от pH [205]. В PBS и клеточной среде DMEM водородный показатель поддерживается на постоянном уровне близком к нейтральному (pH=7,2-7,4), о чем свидетельствовало сохранение этими средами красного цвета в течение всего времени исследования. Скорость деградации в PBS и DMEM полимерных цепочек образцов не зависит от pH. Однако из работы Gumargalieva and Zaikov (2000) известно, что в средах, содержащих неорганические соли, вследствие каталитической активности анионов

многоосновных кислот процесс деградации ускоряется [178]. Концентрация солей в среде DMEM по сравнению с PBS в несколько раз выше, что вероятно и служит объяснением более значительного уменьшения молекулярной массы ПКЛ в среде DMEM. Продукты реакции гидролиза при их накоплении в водной среде способны значительно ускорить процесс распада макромолекул, что хорошо видно на примере гидролиза ПДЛГА в воде. Низкая скорость деградации каркасов на основе ПКЛ в водных средах объясняется его высокой степенью кристалличности. Повышенная скорость резорбции каркасов в желчи по сравнению с другими средами хорошо заметна на начальном этапе исследований через 14 суток. Желчь обладает низким поверхностным натяжением, поэтому кинетика гидролиза может определяться интенсивной диффузией желчи в структуру волокнистого материала. Ускорение процесса гидролиза может происходить и за счет пищеварительных ферментов, содержащихся в небольшом количестве в желчи [88]. В окислительной среде H_2O_2 процесс разрушения полимерных цепей также активировался [130]. По этой причине в среде желчи и H_2O_2 молекулярная масса и прочностные свойства на начальном этапе исследований снижались быстрее. Использование H_2O_2 позволило смоделировать процесс воспаления в организме, сопровождающийся продуцированием макрофагами и нейтрофилами соединений, содержащих активный кислород, при их взаимодействии с поверхностью полимерных материалов [182].

В литературе отмечается, что электроформованные волокна из ПКЛ быстро резорбируют, о чем свидетельствует снижение массы образцов, изменение морфологии волокон и снижение прочности на фоне неизмененной молекулярной массы [111, 226], при этом различные типы и концентрации ферментов приводят к более медленной или более быстрой деградации [282, 286]. Например, в работе Brugmans (2015) поверхностная эрозия идентифицировалась в качестве доминирующего механизма деградации с явными последствиями для морфологии поверхности волокна [111], по-видимому, вследствие ограниченных возможностей ферментов проникать в гидрофобный полукристаллический ПКЛ, либо скомпрометированной активности ферментов при инфильтрации [88, 240]. В

работе Lam et al. (2008) по изучению резорбции полимеров в физиологических условиях отмечается, что механические характеристики образцов волокнистого ПКЛ, с волокнами диаметром 300 мкм, снижаются до критически низких значений уже через 4 недели экспозиции в PBS, несмотря лишь на незначительные изменения молекулярной массы [226].

Полученные нами результаты по фрагментации и резорбции материала ПКЛ-каркасов *in vivo* на 10% на сроках 64 сут. могут быть объяснены не только ферментативной активностью организмов мелких лабораторных животных, но также и уплотнением соединительной ткани в зоне контакта с материалом. Изучение уровней биорезорбции *in vivo* показало, что наименьшая степень изменений наблюдалась у материала с высокой концентрацией инкорпорированного препарата НВГ, что может объясняться как сниженным уровнем автокаталитической деградации материала вследствие интенсивного сосудистого роста, способствующего удалению продуктов биодеградации из зоны имплантации, так и простым уплотнением соединительной ткани. Предполагаемые процессы автокаталитической деградации *in vivo* ранее уже наблюдались при имплантации полимерных материалов [148]. Наблюдаемый нами эффект снижения темпов биорезорбции при увеличении плотности распределения сосудов не компенсировался даже увеличением доступностью материала для макрофагов вследствие более высокой васкуляризации.

Различными авторами показано, что необходимым условием для формирования новой ткани на основе ТИК является баланс между свойствами каркаса и композицией БАС [54, 278]. Полученные результаты позволяют подбирать условия биорезорбции волокнистого каркаса синхронизованно с естественными репарационными процессами в организме реципиента как за счет подбора физико-механических свойств волокнистого каркаса, так и за счет заранее подобранных параметров инкорпорирования БАС в структуру полимерных волокон.

Полученные в работе результаты позволяют оценить аксиальную прочность имплантируемых компонентов ТИК из полученного методом эмульсионного

электроформования волокнистого ПКЛ в 2,1±0,5 МПа, что значительно ниже значения у нативного желчного протока (4,1±0,25 МПа), и для обеспечения физиологической совместимости требует использования композитных конструкций с толщиной высокопористой волокнистой стенки как минимум в 2 раза большей (без учета изменения механических свойств при биорезорбции) нормального физиологического значения для стенки желчного протока (1 мм). Однако использование полимерной пленки в составе композитной конструкции позволяет достичь аксиальной прочности в 9,2±0,5 МПа спустя 2 мес. деградации *in vitro*, тем самым позволяя снизить толщину стенки конструкции до физиологически совместимого значения в 1 мм.

Возникающее при пассаже желчи гидродинамическое давление составляет 80-140 мм вод.ст. (~0,001 МПа) в норме, а при различных патологиях может возрастать до 300 мм вод.ст. (~0,003 МПа) и разрушить слишком быстро деградирующую конструкцию из хрупких материалов [181]. Полученные в работе значения радиальной прочности многослойных каркасов ТИК в 5,5-3,5 МПа соответствуют значениям нативного протока и позволяют уверенно сдерживать давление желчетока в течение всего срока имплантации.

Полученный каркас многослойной конструкции показал достаточные пластические свойства: относительное удлинение $\delta_{тик}$ составляло до 108±12%, что превышает показатели нативного желчного протока (32±5%) и является достаточным значением для погружного дренажа.

4.4. Клеточная, тканевая и физиологическая совместимость волокнистых материалов

В настоящей работе скрининг биосовместимости материалов был выполнен тремя способами: 1) цитосовместимость материалов оценивалась косвенно на основе измерения метаболической активности клеток МТТ-тестом, 2) биологическая совместимость оценивалась при заселении конструкций клетками *in vitro* с окрашиванием на Live/Dead, и по тканевой реакции при имплантации материала крысам, 3) физиологическая совместимость оценивалась по тканевой

реакции при имплантации трубчатой волокнистой конструкции в просвет желчного протока свиньи.

Среди недостатков метода МТТ-теста отмечают накопление конечных продуктов в клетке и невозможность дальнейшего использования исследуемого материала вследствие высокой цитотоксичности продуктов реакции. Также отмечается, что в случае повышенного проникновения клеток в структуру волокнистой конструкции [305] при толщине конструкций порядка 1 мм [90] целесообразным является использование модифицированного МТТ-теста с растворением конструкции каркаса до солюбилизации образовавшегося формазанового красителя, что требует предварительного подбора соответствующих растворителей для каждого типа материала конструкции. В противном случае мигрировавший вглубь материала объем клеток остается незамеченным, а замеру подвергаются клетки лишь на поверхности конструкции, что в наибольшей степени относится к клеткам с высоким потенциалом к миграции вдоль волокон каркаса при длительном культивировании. Тем не менее, использованный в работе метод тестирования волокнистых полимерных каркасов с использованием МТТ-теста показал свою эффективность для выбора материалов с наилучшей цитосовместимостью.

Биологическая совместимость материала оценивалась при анализе образцов волокнистого материала, имплантированного крысам. Физиологическая совместимость волокнистого материала оценивалась по воспалительной реакции в тканях желчного протока свиньи, которой был имплантирован трубчатый каркас из ПКЛ. Полученные нами результаты говорят о биологической и физиологической совместимости волокнистых конструкций из ПКЛ, что подтверждается отсутствием в зоне имплантации материалов выраженной воспалительной реакции. Данные результаты согласуются с работами других авторов в данной области [64, 380], и в целом соответствуют современным подходам к оценке тканеспецифичной биосовместимости материалов конструкций не только *in vitro* тестированием, но также и посредством физиологически совместимой имплантации *in vivo* [215, 373].

По данным литературы физиологически совместимые конструкции при имплантации в организм должны сохранять механические свойства в определенном диапазоне значений модуля упругости и прочности *(E; σ)* [254]. Модуль упругости $E_{тканей}$ для предотвращения тканевой ишемии, перфорации и обеспечения состоятельности анастомоза не должен превышать значений для нативных тканей более чем в 2 раза, в то время как прочность ТИК не должна быть менее ⅓ от значения нативных тканей [338], что для ТИК желчного протока дает диапазон (11-44 МПа; >1,2 МПа) Проведенная оценка физико-механических свойств каркасов показала физиологическое соответствие параметров конструкции (14±2 МПа; 11±1 МПа) требуемым значениям (Рис. 4.1).

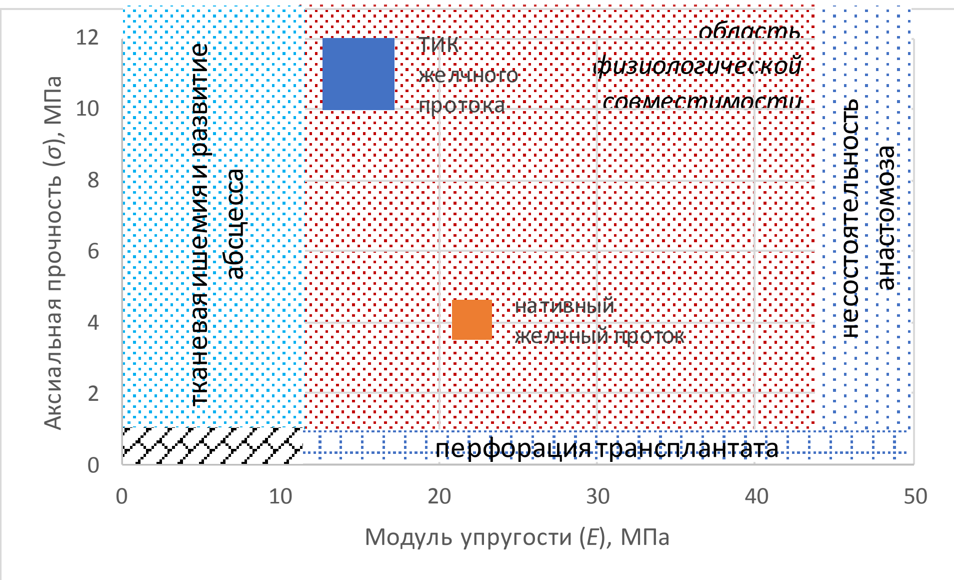


Рисунок 4.1 Область физиологической совместимости *(E; σ)* физико-механических параметров ТИК желчного протока

4.5. Ангиогенная модификация материала каркаса биологически активным соединением

Обеспечение биологической и физиологической совместимости ТИК достигается различными способами, например, префабрикацией заготовки, использованием децеллюляризованного нативного биоматериала в качестве ВКМ, а также использованием различных БАС для функционализации нативного матрикса или искусственного каркаса.

Способом обеспечения необходимой васкуляризации в настоящей работе было выбрано использование факторов роста, высвобождение которых в зоне трансплантации способно стимулировать локальное развитие сосудистой сети и стимулировать функционализацию трансплантата. В современных работах использование БАС при формовании и префабрикации ТИК выполняется методами, позволяющими обеспечить пролонгированное высвобождение [274, 331], при этом отмечается преимущество продленного высвобождения БАС из структуры полимера в виде продолжительного физиологического эффекта по сравнению с локальным введением или внесением в форме покрытия поверхности материала [331]. Ранее было показано, что использование ангиогенных факторов роста при покрытии или внедрении в структуру полимерного материала способствует образованию эндотелия и развитию сосудистой сети в зоне имплантата [53, 56].

В настоящей работе использовался феномен спонтанной трансформации плазмид животными клетками. Например, в работе Brygger (2009) проводилась поверхностная модификация полученного электроформованием волокнистого ПКЛ с использованием ДНК-плазмиды, кодирующей последовательность флуоресцентного белка GFP [112]. Возможные молекулярные механизмы проникновения плазмидных конструкций, несущих ген ангиогенного фактора VEGF, в животные клетки подробно рассмотрена в работе Григорян А.С. и Шевченко К.Г. (2011) [18]. Плазмида с встроенным терапевтическим геном преодолевает плазматическую мембрану трансфецируемой клетки, и проникает в нее посредством эндоцитоза [263] или гидродинамической трансфекции [351, 390]. В работе Pollard and Remy (1998) была показана слабая экспрессия плазмид, внесённых в цитоплазму клетки, что указывало на их частичное проникновение в ядро, однако механизм, лежащий в основе этого явления, остаётся неизученным [18, 292].

Использованная в настоящей работе методика эмульсионного электроформования позволяет получать волокна с пролонгированным высвобождением БАС [108, 194]. Данная методика более физиологична, чем

инкорпорирование молекул БАС в объем материала, поскольку не предусматривает формирования химических связей с молекулами полимера.

Изучение динамики сосудистого роста в контрольной группе выявило увеличение плотности распределения сосудов со временем, что полностью согласуется с данными других авторов об этапности сосудообразования *in vivo* [184]. Например, в работе Zhou et al. (2012) по изучению влияния на ангиогенез белкового фактора bFGF плотность распределения сосудов при имплантации контрольного коллагенового каркаса составила 22,2±5,7 мм$^{-2}$, а при имплантации активированного bFGF-коллагенового каркаса составляла 30,0±4.8 мм$^{-2}$ (рост на 35%) [392]. Использование преваскуляризированных трансплантатов из альгината в работе Dvir et al. (2009) показало увеличение плотности сосудов с 25 до 60 мм$^{-2}$ на 7-й день имплантации, при этом пик васкуляризации приходился на 10-й день [150]. В полученных нами результатах наблюдалась та же закономерность, при этом на 33-и сутки оказывала влияние высокая концентрация препарата НВГ и плотность распределения сосудов была достоверно выше, чем в контроле и в образцах с низкой концентрацией препарата НВГ. На 46-е и 64-е сутки после имплантации параллельно с биорезорбцией полимерных волокон каркаса (разрушение и фрагментация волокнистого материала), наблюдалось уменьшение различий в группах по сравнению с контролем, обусловленное схлопыванием микрососудов, образованных во время начального васкулогенеза, при прекращении воздействия стимулирующих сосудообразование факторов. Таким образом, витализация биосовместимых и биодеградируемых каркасов генотерапевтическим препаратом возможна с тем же физиологическим эффектом, что и при использовании рекомбинантных белковых факторов роста.

Сравнение абсолютного значения полученного уровня васкуляризации тканей (VD=41,76±0,12 мм$^{-2}$, 33 сут, ВКп) с васкуляризацией нативных тканей желчных путей (92±16 мм$^{-2}$) показало недостаточность полученного ангиогенного эффекта для получения биоэквивалента стенки желчного протока при трансплантации ТИК. В дальнейшем, с целью получения необходимого уровня васкуляризации, потребуется увеличение концентрации БАС в волокнистом

материале по сравнению с использованной в эксперименте концентрацией генотерапевтического препарата (высокая концентрация препарата составляла $4{,}1\times10^{-4}$ грамм НВГ на 1 грамм ПКЛ). Выявленная дозозависимость полученного эффекта позволяет добиться увеличения уровня васкуляризации за счет увеличения концентрации генотерапевтического препарата в материале, либо использования комбинированной смеси препаратов (нуклеиновокислотные и белковые молекулы) в достаточной концентрации.

Поддержка роста иных специализированных клеток (мышечных, нервных) может быть достигнута посредством использования слоев, нагруженных специализированными БАС. Например, в исследовании Zhang et al. (2013) показано, что полученные электроформованием двухслойные синтетические волокнистые каркасы, нагруженные VEGF и PDGF во внутреннем и наружном слоях, соответственно, способствовали адгезии, пролиферации и регенерации сосудистых эндотелиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры посредством высвобождения VEGF и PDGF [391]. В экспериментальной работе Антоновой Л.В. и соавт. (2018) на крысах было показано, что послойное инкорпорирование в состав волокнистых каркасов из биосовместимых полимеров композиции БАС в составе VEGF, bFGF и хемоаттрактантной молекулы SDF-1α улучшало морфологию и механические свойства графтов, способствовало полноценной эндотелизации имплантата по сравнению с использованием только VEGF, а включение bFGF также ускоряло формирование гладкомышечного слоя [2].

Сравнение относительного уровня васкуляризации в образцах и контроле на различных сроках показывает различия в 1,13±0,17 раз (16 сут, ВКп), 1,43±0,59 раза (33 сут, ВКп) и 1,07±0,45 (46 сут, ВКп), что только лишь для значения на сроке 33 сут. является достаточным для выполнения предъявляемых к конструкции требований по межтканевому сопряжению (требование Т.7 : $VD_{слоя}/VD_{окр.тк.} \geq 1{,}3$). Таким образом для получения требуемых различий уровня васкуляризации интактных и функционализированных тканей на всех сроках имплантации в течение 2 мес. потребуется использовать материалы с более высокой кинетикой резорбции, например полученный электроформованием волокнистый ПДЛГА, или

значительно большие концентрации генотерапевтического препарата «Неоваскулген».

Отмеченная в литературе повышенная ферментативная активность в организмах мелких лабораторных животных, по сравнению с человеком, могла повлиять на результаты таких экспериментов, в частности на повышенный уровень ферментативного гидролиза имплантированных материалов [113, 119]. В этом случае для уточнения параметров дизайна ТИК потребуется проведение дополнительных экспериментов по уточнению кинетики биорезорбции каркасов на крупных лабораторных животных (свиньи, собаки), для которых уровень ферментативной активности примерно соответствует значениям для организма человека [354].

4.6. Двухэтапная витализация биосовместимого многослойного волокнистого каркаса клеточными культурами

В настоящее время известны работы по витализации графтов из синтетических материалов путем заселения их клеточными культурами из различных источников [48, 152, 358]. В настоящей работе витализация материала ТИК с использованием двух различных клеточных культур (ЭКЖП и ММСК КМ) для достижения различных эффектов – снижения иммуногенности материала конструкции, снижение уровня инфильтрации желчью внутренних слоев конструкции, а также обеспечения заместительной регенерации за счет вытеснения заселенных на материал ЭКЖП и ММСК КМ.

Нами было определено, что ключевыми требованиями к обеспечению физиологической совместимости ТИК желчного протока является реализация физиологической многослойности, обеспечение прошиваемости, предотвращение пролива желчи, и высокая степень васкуляризации стенок трансплантата для предотвращения развития хронических инфекций и стимулирования эпителизации стенок трансплантата.

В настоящей работе для обеспечения физиологической совместимости был использован принцип витализации, то есть модификации материала графта с целью

придания ему элементов и свойств живого для функционализации окружающих такой имплантат тканей. Использование метода инкорпорирования в волокна биомолекул позволяет стимулировать репарационные процессы за счет постепенного выхода БАС, по аналогии с секрецией биомолекул живыми тканями. Использование клеточных культур в составе графтов позволяет снизить иммуногенность материала, а также рассчитывать на механизмы заместительной регенерации при имплантации такого графта в организм реципиента. Ранее для витализации материала имплантатов использовались ткани [10, 63], клеточные культуры [321, 395], биологические молекулы [324], или комбинации витализирующих агентов [151, 173].

Например, в работе Soliman et al. (2018) была создана *in vitro* ТИК пищевода, состоящая из трубчатого трехслойного каркаса, полученного методом электроформования из биосовместимого полимера полиуретана и заселенного с внешней стороны гладкомышечными клетками, а с внутренней – ММСК из жировой ткани [335]. При этом срединный слой конструкции с плотной организацией волокон был предназначен для физического разделения двух клеточных культур в составе конструкции. Дизайн предполагал стимулирование ангиогенеза за счет присутствия на внутренней части конструкции ММСК из жировой ткани, и развитие необходимый для перистальтики мышечного слоя за счет заселения внешней части конструкции гладкомышечными клетками. Предполагалось спонтанное нарастание эпителия из оставшейся дистальной ткани пищевода.

В работе Struecker et al. (2016) на модели свиньи была проведена имплантация на срок 14 дней децеллюлированных аллогенных кровеносных сосудов, заселенных аутологичными холангиоцитами. В период наблюдения у животных не было выявлено серьезных осложнений, в том числе отсутствовали признаки пролива желчи и перитонита. Ткань трансплантатов была инфильтрирована нейтрофилами и наблюдался неоангиогенез [349].

В нашей работе был предложен и обоснован метод двухэтапной витализации материала с использованием клеточных культур и БАС, который должен

способствовать различным типам регенерационного ответа – регенерации по каркасу и заместительной регенерации. Результатом таких регенерационных процессов *in vivo* должен стать новообразованный биоэквивалент желчного протока, содержащий слои эпителиальных клеток, кровеносных сосудов, и субсерозной соединительной ткани. Причем за счет паракринной регуляции заселенных на каркасы ММСК КМ должно будет происходить не только новообразование сосудов, как было показано ранее в работах [306, 350], но также и стимулирование образования гладкомышечных клеток, и поддержание здорового роста соединительной ткани [157, 381]. Оставшиеся нереализованными при таком подходе функциональные слои, присутствующие в нормальном желчном протоке (мышечный, нервный, интерстиций), оставляют слишком большое пространство для фундаментальных научных исследований. Например, слой мышечных клеток в желчных протоках образует густую петлистую сеть, однако его значение в физиологии желчных путей, а тем более и в патологии, до сих пор еще сравнительно мало изучено [22, 57, 95, 250]. Слой нервных клеток по всей видимости является одним из трансмиттеров нервно-гуморальной регуляции, и по всей видимости тесно связан с мышечным слоем [72, 143]. Гетерогенность организации микроканальцев интерстиция соединительной ткани также представляет собой сравнительно малоизученную область современной патофизиологии [98, 121].

Разработанная в настоящей работе ТИК желчного протока с двухэтапной витализацией ангиогенными факторами и клеточными культурами при имплантации предполагает использование двойного регенерационного ответа организма реципиента – не только регенерацию по рассасывающемуся каркасу, но и заместительную регенерацию путем замещения клеток, заселенных ранее на каркас, за счет чего в том числе и будет происходить функционализация имплантата (Рис. 4.2).

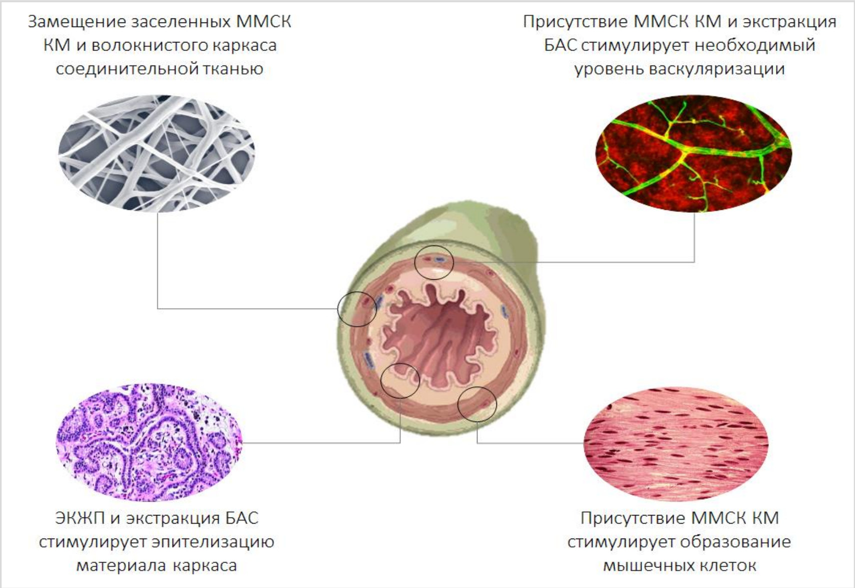


Рисунок 4.2 Предполагаемые процессы восстановительной регенерации тканей желчного протока при имплантации многослойной ТИК

Ранее в экспериментальных работах на животных было установлено, что при реконструкции внепеченочного протока мини-свиней с использованием коллагенового каркаса, модифицированного rhFGF, образование полного монослоя $CK19^{+}$-ЭКЖП фиксировалось спустя 8 недель после проведения операции [235]. Использование каркаса на основе PLCL (50:50), армированного волокнами PGA, при реконструкции желчного протока потребовало 6-и месяцев для регенерации эпителия в случае полноценного протеза [257] и 4-х месяцев при использовании заплаты размерами 20 мм × 10 мм [69].

Общий каскад механизмов восстановительной регенерации желчных путей при экспериментальном исследовании витализированных биосовместимых имплантатов представлен на рисунке 4.3.

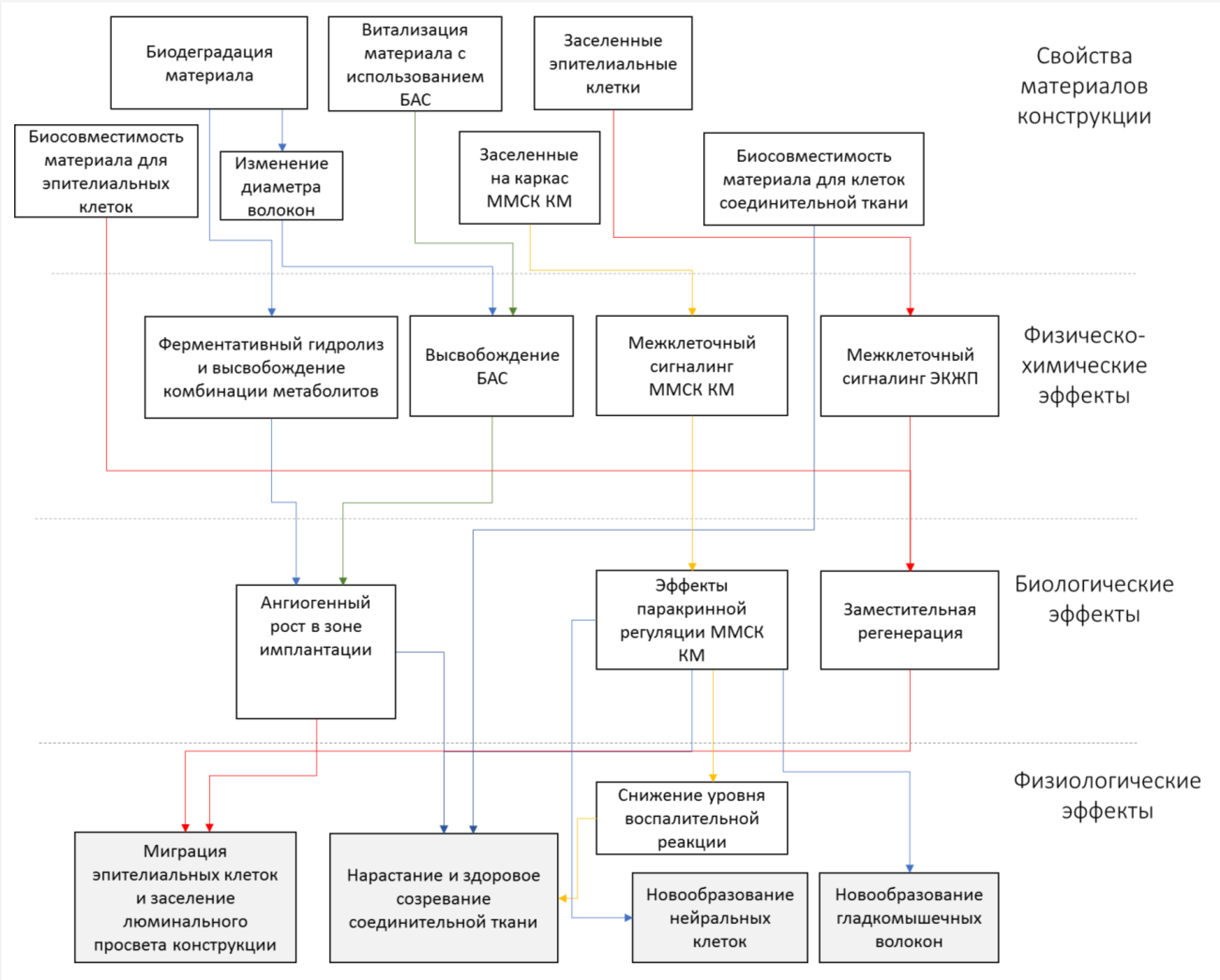


Рисунок 4.3 Каскад биофизических, биологических и физиологических процессов восстановительной регенерации желчных путей при использовании витализированных конструкций из биосовместимых и биодеградируемых материалов

Разработанные в настоящей работе методы получения биологически и физиологически совместимой ТИК желчного протока могут быть использованы в качестве элементов биоконструктора для разработки и создания тканеинженерных конструкций и моделей полых эпителиальных органов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Систематический обзор ретроспективных данных по реконструктивным и восстановительным операциям на желчных путях и их исходах позволил разработать функциональные требования к тканеинженерной конструкции желчного протока, применить многослойный подход к созданию синтетического трансплантата желчного протока и определить необходимые параметры васкуляризации трансплантата.

Режим изготовления модифицированных каркасов из эмульсии с использованием плюроника F-127 позволяет электроформовать каркасы ТИК желчного протока, содержащие БАС белкового и нуклеиновокислотного типа, в том числе зеленый флуоресцентный белок, эпидермальный фактор роста, генотерапевтический препарат “Неоваскулген”, или их смеси в необходимой концентрации. Волокнистые каркасы из ПКЛ при модификации биологически активными соединениями уменьшают свою прочность на 60-70%, и при биорезорбции модифицированных препаратом “Неоваскулген” каркасов обеспечивают увеличение плотности распределения сосудов в месте имплантации.

Многослойные каркасы из ПКЛ и ПДЛГА сохраняют свои механические свойства с прочностными характеристиками, соответствующими нативному желчному протоку. Структура изготовленных волокнистых каркасов позволяет клеткам заселять их на всю глубину. Заселение волокнистого каркаса клетками не приводит к существенному изменению его механических свойств.

Двухслойное заселение модифицированного каркаса клеточными культурами ММСК и ЭКЖП позволяет создать ТИК желчного протока для проведения патофизиологического эксперимента по оценке биологической и физиологической совместимости на крупном лабораторном животном.

ВЫВОДЫ

1. Многослойная тканеинженерная конструкция, созданная с учетом основ функционального проектирования, соответствует требованиям, предъявляемым к имплантату желчного протока по следующим биологическим параметрам: отсутствие цитотоксичности для стандартных линий клеток; наличие цитосовместимости полимерных слоев с адгезированными клетками; адекватная геометрия поверхности каркасов, позволяющая формировать монослой первичными культурами клеток; достаточная механическая прочность конструкции; сохранение длительной толерантности к агрессивным компонентам желчи; обеспечение пролонгированных сроков биорезорбции каркаса после имплантации; обеспечение предотвращения билиарного сладжа; обеспечение требуемой прочности, упругости и пластичности; и обеспечение прорастания кровеносных сосудов при имплантации конструкции.

2. Комплексное исследование свойств волокнистых поли(лактид-со-гликолидов), поликапролактона, диацетата целлюлозы, поли(D,L-лактид-со-ε-капролактона) путем тестирования их физико-механических параметров в модельных системах (в реактиве Фентона, фосфатном буфере, воде, желчи, культуральной среде с сывороткой и без нее), а также скрининг их цитосовместимости с использованием клеток мезенхимального (NIH/3T3) и эпителиального (MCF-7) происхождения, позволило создать трубчатый трехслойный каркас с внешним слоем из поли(L,D-лактид-со-гликолида), средним слоем из непроницаемых склеенных волокон поликапролактона и внутренним слоем из волокон поликапролактона. Слои такого трехслойного каркаса обладают различной кинетикой деградации в модельных системах, позволяющей сохранять механические свойства на уровне нативного желчного протока и достаточные пластические свойства в течение 2-х месяцев.

3. Модификация каркаса эмульсионным инкорпорированием эпидермального фактора роста в волокнистый поликапролактон приводит к

пролонгированному выходу белка из объема полимерного волокна *in vitro* по мере резорбции материала с максимальным выходом в первые 3 недели (от 200 до 280 пкг/мл) и стимулированию пролиферации клеток линии MCF-7.

4. Витализация каркаса эмульсионным инкорпорированием генотерапевтического препарата “Неоваскулген” (плазмида VEGF165) в волокна поликапролактона способствует увеличению плотности распределения сосудов на 43% в зоне имплантации каркаса крысам линии Вистар спустя 1 месяц и снижению плотности распределения сосудов до контрольных значений на 2-м месяце.

5. Динамическое культивирование путем вращения каркасов в культуральной среде повышает эффективность витализации каркаса клеточными культурами при создании многослойной тканеинженерной конструкции желчного протока по сравнению со статическим способом заселения клетками, и обеспечивает возможность заселения мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга с жизнеспособностью в волокнистом материале более 85%.

6. Культивирование волокнистого трубчатого каркаса в контакте с люминальной поверхностью нативного желчного протока создает условия для миграции и адгезии эпителиальных клеток желчного протока на каркас, что позволяет витализировать каркас для получения многослойной тканеинженерной конструкции.

7. Имплантация волокнистого трубчатого каркаса из поликапролактона в общий желчный проток свиньи подвида *Sus scrofa domesticus* не вызывает отторжения и не приводит ни к обструкции материала солями желчных кислот, ни к образованию билиарного сладжа в течение 1-го месяца.

БЛАГОДАРНОСТИ

Подготовка данной работы была бы невозможна без неоценимой помощи и поддержки профессора Татьяны Геннадьевны Дюжевой.

Огромную благодарность также хотел бы выразить коллективу квалифицированных и внимательных соратников, которые помогали в моей работе. Прежде всего моему научному руководителю Алексею Валерьевичу Люндупу, квалифицированному исследователю и чуткому преподавателю Михаилу Евгеньевичу Крашенинникову, моим коллегам – Максиму Витальевичу Балясину, Ольге Андреевне Красильниковой, Анне Гасымовне Демченко, Алексею Леонидовичу Файзуллину, талантливым хирургам Александру Сергеевичу Титову и Даниилу Леонидовичу Мудряку, сотрудникам лаборатории полимерных материалов НИЦ “Курчатовский институт” – Алексею Дмитриевичу Шепелеву, Тимуру Хасяновичу Тенчурину и профессору Сергею Николаевичу Чвалуну.

Также отдельно хотелось бы поблагодарить моих друзей, не будь которых, реализация данного проекта была бы невозможной – руководителя фонда “Наука за продление жизни” и выдающегося педагога Михаила Александровича Батина, основателя компании “Институт стволовых клеток человека” Артура Александровича Исаева, заведующего кафедрой патологической анатомии с курсом судебной медицины Рязанского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, кандидата медицинских наук Романа Вадимовича Деева, генерального директора компании “Гистографт”, кандидата медицинских наук Илью Ядигеровича Бозо, а также генерального директора Биомедицинского холдинга “Атлас” Сергея Владимировича Мусиенко.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активное соединение

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВКп – высокая концентрация препарата “Неоваскулген”

ГМКИТ – гигантские многоядерные клетки инородных тел

ДАЦ – диацетат целлюлозы

ИФА – иммуноферментный анализ

КМ – костный мозг

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

НВГ – генотерапевтический препарат “Неоваскулген”

НКп – низкая концентрация препарата “Неоваскулген”

ПАВ – поверхностно активное вещество

ПГА (PGA) – полигликолид

ПДЛА (PDLA) – поли(D,L-лактид)

ПДЛГА (PLGA) – поли(D,L-лактид-со-гликолид)

ПКЛ (PCL) – поли-ε-капролактон

ПЛА (PLA) – полилактид

ПЛК (PLCL) – поли(L-лактид-со-ε-капролактон)

ПЛЛГА (PLLGA) – поли(L-лактид-со-гликолид)

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТИК – тканеинженерная конструкция

ХФ – хлороформ

ЭКЖП – эпителиальные клетки желчного протока

CK – цитокератин

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's medium (среда Игла, модифицированная Дульбекком)

DMSO – Dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)

DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline (буфер фосфатный Дальбекко)

FGF2 или bFGF – basic fibroblast growth factor (основной фактор роста фибробластов)

EGF – epidermal growth factor (эпидермальный фактор роста)

GFP – green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок)

KGF – keratinocyte growth factor (фактор роста кератиноцитов)

KSFM – keratinocyte serum-free medium (бессывороточная среда для культивирования кератиноцитов)

PBS – phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

PDGF – platelet-derived growth factor (тромбоцитарный фактор роста)

PEG – Polyethylene glycol (полиэтиленгликоль)

PLLA – поли-L-молочная кислота

VEGF – vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)

ЛИТЕРАТУРА

1. Амиранашвили И.Д., Кавтарадзе М.Н., Беришвили Э.Р. Пластика гепатикохоледоха эксплантатами и аутотрансплантатами // Медицинские новости Грузии. – 2005. – №12(129). – С. 120–123.

2. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Кутихин А.Г., и др. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1α и VEGF на процессы формирования in vivo тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. –2018. – Т. 20. – № 1. – С. 96–109.

3. Арутюнян И.В., Тенчурин Т.Х., Кананыхина Е.Ю., и др. Нетканые материалы на основе поликапролактона для тканевой инженерии: выбор структуры и способа заселения // Гены и клетки. – 2017. – Т.12. – № 1. – С. 62–71.

4. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспектива / А.Г. Бабаева. М.: Издательство РАМН, 2009. – 336 с.

5. Башкиров А.Ф. Хроническая непроходимость общаго желчнаго протока и оперативное лѣченіе ея. Дисс. … доктора медицины. СПб: Императорская военно-медицинская академия. 1909.

6. Бозо И.Я., Майорова К.С., Дробышев А.Ю., и др. Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных ДНК. // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11. – № 4. – С. 34–42.

7. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я. Медицинская микробиология (компендиум): учебное пособие для студентов медицинских вузов. Екатеринбург: УрО РАН, 2009. – 247 с.

8. Васильев А.В., Батин М.А. «Дорожная карта» регенеративной медицины // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5. – № 2. – С. 89–90.

9. Вачнадзе Д.И., Брешенков Д.Г., Дыдыкин С.С. Анестезиологическое пособие у свиней как модельного объекта в медико-биологических и биотехнологических исследованиях. // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2016. – № 4(59). – С. 37–46.

10. Гальперин Э.И., Татишвили Г.Г., Иванов А.Е. и др. Пластика желчных протоков васкуляризованным аутовенозным трансплантантом в эксперименте и клинике. // Хирургия. – 1980. – № 6. – С. 10–15.

11. Гальперин Э.И. Заболевания желчных путей после холецистэктомии / Э.И. Гальперин, Н.В. Волкова. М.: Медицина, 1988. – 272 с.

12. Гальперин Э.И., Кузовлев Н.Ф. Реконструктивные операции при стриктурах общего желчного и печеночных протоков // Хирургия. – 1978. – № 1. – С. 63–72.

13. Гальперин Э.И., Кузовлев Н.Ф., Карагюлян С.Р. Рубцовые стриктуры желчных протоков. М.:

Медицина, 1982. – 240 с.
14. Гальперин Э.И., Чевокин А.Ю. Факторы, определяющие выбор операции при «свежих» повреждениях магистральных желчных протоков // Анналы хирургической гепатологии. – 2009. – Т. 14. – № 1. – С. 49–56.
15. Голяницкий И.А. Пересадка тканей / И.А. Голяницкий. Астрахань: Тип. №12 Губсовнархоза, 1922. 160 с.
16. Горбунов О.М., Дяченко Л.А., Русаков В.М. Экспериментальное обоснование аутовенозной пластики в хирургии желчных путей // Клиническая хирургия. – 1982. – № 9. – С. 21–23.
17. Горбунов О.М., Сахно В.Д. Клиническая оценка способа аутовенозной пластики внепеченочных желчных протоков // Вестник хирургии им. И.И.Грекова. – 1994. – Т. 152. – № 3–4. – С. 55–60.
18. Григорян А.С., Шевченко К.Г. Возможные молекулярные механизмы функционирования плазмидных конструкций, содержащих ген VEGF // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6. – № 3. – С. 24–28.
19. Гуманенко Е.К. Военно-полевая хирургия локальных войн и вооруженных конфликтов: руководство для врачей / Е.К. Гуманенко, И.М. Самохвалов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 672 с.
20. Демихов В.П. Пересадка жизненно важных органов в эксперименте / В.П. Демихов. Москва: Медгиз, 1960. – 260 с.
21. Дземешкевич С.Л. Создание биоинженерных органов, стволовые клетки и добросовестность научных исследований в хирургии // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б. В. Петровского. – 2015. – Т. 3. – № 1. – С. 80–85.
22. Добряков Б.С., Бравве И.Ю., Бородач А.В. Морфофункциональные особенности внепечёночных желчных путей // Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – Т. 64. – № 4. – С. 21–26.
23. Дюжева Т.Г., Савицкая Е.Е., Котовский А.Е., и др. Биодеградируемые материалы и методы тканевой инженерии в хирургии желчных протоков // Анналы хирургической гепатологии. 2012. – Т. 17. – № 1. – С. 94–99.
24. Дюжева Т.Г., Люндуп, А.В., Клабуков, И.Д., и др. Перспективы создания тканеинженерного желчного протока // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11. – № 1. – С. 43–47.
25. Евдокимов С.В., Баулин А.В., Евдокимов М.Е., и др. Некоторые особенности организации проведения хирургического эксперимента на свиньях. // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1–5. – С. 756–759.
26. Ермолов А.С., Упырев А.В., Иванов П.А. Хирургия желчнокаменной болезни: от пройденного к настоящему // Хирургия. – 2004. – № 5. – С. 4–9.
27. Журавлев В.А., Русинов В.М., Булдаков В.В. Билиарная реконструкция при резекции печени

// Анналы хирургической гепатологии. – 2011. – Т. 16. – № 4. – С. 46–50.
28. Итала Э. Восстановление хирургических повреждений общего желчного протока / Э. Итала. М.: Медицинская литература, 2006. – 134 с.
29. Кедик С.А., Жаворонок Е.С., Седишев И.П., и др. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор). Перспективные синтетические и природные полимеры. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 2. – С. 18–35.
30. Ковалев А.В. Проблемы создания биоискусственных органов на примере трахеи. [Электронный ресурс]. URL: http://www.limbt.com/page/120/.
31. Копчак В.М. Хирургическая анатомия поджелудочной железы / В.М. Копчак, А.Ю. Усенко, К.В. Копчак, А.И. Зелинский, Киев: Аскания, 2011. 141 с.
32. Кузнецов С.Л. Гистология, цитология и эмбриология. / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров, Москва: МИА, 2007. 449 с.
33. Лиознер Л.Д. Основные проблемы учения о регенерации. / Л.Д. Лиознер. М.: Издательство “Наука”, 1975. 103 с.
34. Лопухин Ю.М. Экспериментальная хирургия. / Ю.М. Лопухин. М.: Медицина, 1971. – 346 с.
35. Лоранская И.Д., Ракитская Л.Г., Малахова Е.В. и др. Лечение хронических холециститов. // Лечащий врач. – 2006. – № 6. – С. 12–17.
36. Люндуп А.В., Онищенко Н.А., Шагидулин М.Ю. и др. Стволовые/прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. 12. – № 2. – С. 100–107.
37. Люндуп А.В., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. и др. О роли синусоидальных клеток печени и клеток костного мозга в обеспечении регенераторной стратегии здоровой и поврежденной печени. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. – Т. 12. – № 1. – С. 78–85.
38. Люндуп А.В., Медведев Ю.А., Баласанова К.В. и др. Методы тканевой инженерии костной ткани в челюстно-лицевой хирургии // Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. – Т. 68. – № 5. – С. 10–15.
39. Макаренко Т.П. Современное состояние и пути дальнейшего развития хирургической гепатологии. / Т.П. Макаренко. М.: Медицина, 1975. – 301 с.
40. Марков П.В. Отдаленные результаты реконструктивных и восстановительных операций на внепеченочных желчных протоках // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 160.
41. Марков П.В. Восстановительная и реконструктивная хирургия внепеченочных желчных протоков: дисс. … докт. мед. наук. Краснодар: Кубанский государственный медицинский

университет, 2016. – 301 с.
42. Никитина Э.М., Соболевский В.А., Давыдов М.И. Современные возможности реконструкции трахеи в онкологической практике: обзор литературы // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2012. – Т. 23. – № 2. – С. 34–39.
43. Ничитайло М.Е. Минимально-инвазивная хирургия патологии желчных протоков / М.Е. Ничитайло, В.В. Грубник, А.Л. Ковальчук. Киев: Здоров’я, 2005. 424 с.
44. Павленко С.М. Учение о саногенезе - важнейшая проблема медицины // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1967. – Т. 11. – № 3. – С. 91–95.
45. Панченков Д.Н., Мамалыгина Л.А. Ятрогенные повреждения внепеченочных желчных протоков: диагностика и хирургическая тактика на современном этапе. // Анналы хирургической гепатологии. – 2004. Т. 9. – № 1. – С. 156–163.
46. Петров Б.А., Гальперин Э.И. Хирургия внепеченочных желчных протоков / Б.А. Петров, Э.И. Гальперин. М.: Издательство «Медицина», 1971. – 200 с.
47. Пиковский Д.Л. Г. Кер, С.П. Федоров и хирургия желчных путей: прошлое и настоящее // Анналы хирургической гепатологии. – 1996. – Т. 1. – № 1. – С. 136–143.
48. Решетов И.В., Залянин А.С., Филиппов В.В. и др. Пути витализации биоинженерных конструкции для восстановления опорно-двигательного аппарата // Head and Neck/Голова и шея. Российское издание. – 2016. – № 1–2. – С. 55–59.
49. Родина А.В., Тенчурин Т.Х., Сапрыкин В.П. и др. Пролиферативный и дифференцировочный потенциал мультипотентных мезенхимных стволовых клеток на биосовместимых полимерных матриксах с различными физико-химическими свойствами. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162. – № 10. – С. 486–494.
50. Савостьянов Г.А. Основы структурной гистологии. Пространственная организация эпителиев / Г.А. Савостьянов. СПб: Наука. Ленинградское отделение, 2005. – 376 с.
51. Савостьянов Г.А. Возникновение элементарных единиц многоклеточности и формирование пространственной организации клеточных пластов. // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2012. – № 2. – С. 164–164.
52. Савостьянов Г.А. Возникновение стволовых клеток в развитии многоклеточности и их количественная характеристика. // Цитология. – 2016. – Т. 58. – № 8. – С. 577–593.
53. Севостьянова В.В., Elgudin Y.L., Wnek G.E. и др. Свойства тканеинженерных матриксов из поликапролактона, импрегнированных факторами роста VEGF и bFGF // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – № 3. – С. 62–67.
54. Севостьянова В.В. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста, инкорпорированного в поликапролактоновые графты, в формировании нового сосуда на месте имплантации: дисс. … канд. мед. наук. Кемерово: Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-

сосудистых заболеваний, 2015. – 134 с.
55. Севостьянова В.В., Миронов А.В., Глушкова Т.В. и др. Регенерация кровеносного сосуда на основе графта из поликапролактона в экспериментальном исследовании // Сибирский медицинский журнал. – 2016. – № 1 (31). – С. 53–57.
56. Севостьянова В.В., Антонова Л.В., Барбараш Л.С. Подходы к модификации искусственных матриксов биологически активными молекулами для применения в тканевой инженерии кровеносных сосудов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11. – С. 1960–1970.
57. Ситенко В.М. Постхолецистэктомический синдром и повторные операции на желчных путях / В.М. Ситенко, А.И. Нечай. Л.: Медицина. Ленингр. отделение, 1972. – 240 с.
58. Сытина Е.В., Тенчурин Т.Х., Рудяк С.Г., и др. Сравнительная оценка биосовместимых полимерных матриксов, полученных путем электроформования, и их использование для создания объемных дермальных эквивалентов // Молекулярная медицина. – 2014. – № 6. – С. 38–47.
59. Федоров С.П. Желчные камни и хирургія желчныхъ путей / С.П. Федоров. Петроградъ: Изданіе К.Л. Риккера, 1918. – 288 с.
60. Федоров С.П. Желчные камни и хирургия желчных путей (издание второе) // С.П. Федоров. Л. — М.: Медгиз, 1934. – 392 с.
61. Финкельштейн Б.К. К хирургии желчных путей. О восстановительных операциях на желчных путях // Новый хирургический архив. – 1927. – Т. 13. – № 2. – С. 212–222.
62. Хаспеков-Терпаносян К.Г. Протезирование общего желчного протока при стриктурах (экспериментальное и клиническое исследование): дис. … канд. мед. наук. Ростов-на-Дону: Ростовский государственный медицинский институт, 1972.
63. Шалимов А.А., Шалимов С.А., Ничитайло М.Е., Доманский Б.В. Хирургия печени и желчевыводящих путей. М.: Медицина, 1983. – 512 с.
64. Шехтер А.Б. Тканевая реакция на имплантацию различных материалов. В кн.: Биосовместимые материалы / под ред. М.П. Кирпичникова и В.И. Севостьянова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2011. С. 130–158.
65. Шумаков В.И. Трансплантация печени / В.И. Шумаков, Э.И. Гальперин, Е.А. Неклюдова. М.: Медицина, 1981. – 288 с.
66. Abbott R.D., Kaplan D.L. Strategies for improving the physiological relevance of human engineered tissues. // Trends in biotechnology. – 2015. – V. 33. – № 7. – P. 401–407.
67. Abouna G.M. Organ shortage crisis: problems and possible solutions. // Transplantation proceedings. – 2008. – V. 40. – № 1. – P. 34–38.
68. Aikawa M., Miyazawa M., Okada K. et al. Regeneration of extrahepatic bile duct--possibility to clinical application by recognition of the regenerative process. // Journal of smooth muscle research =

Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi. – 2007. – V. 43. – № 6. – P. 211–218.
69. Aikawa M., Miyazawa M., Okamoto K. et al. A novel treatment for bile duct injury with a tissue-engineered bioabsorbable polymer patch // Surgery. – 2010. – V. 147. – № 4. – P. 575–580.
70. Aikawa M., Miyazawa M., Okamoto K. et al. An Extrahepatic Bile Duct Grafting Using a Bioabsorbable Polymer Tube // Journal of Gastrointestinal Surgery. – 2012. – V. 16. – № 3. – P. 529–534.
71. Al-Himdani S., Jessop Z.M., Al-Sabah A. et al. Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice. // Frontiers in surgery. – 2017. – V. 4. – P. 4.
72. Alexander W.F. The innervation of the biliary system. // Journal of Comparative Neurology. – 1940. – V. 72. – № 2. – P. 357–370.
73. Almany L., Seliktar D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – № 15. – P. 2467–2477.
74. Alpini G., McGill J.M., LaRusso N.F. The pathobiology of biliary epithelia // Hepatology. – 2002. – V. 35. – № 5. – P. 1256–1268.
75. Anderson J.M., McNally A.K. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions // Seminars in Immunopathology. – 2011. – V. 33. – № 3. – P. 221–233.
76. Anderson R., Hoerr S.O. Reconstruction of the common bile duct using split skin grafts. // Plastic and reconstructive surgery. – 1956. – V. 17. – № 3. – P. 203–210.
77. Apalakis A. An experimental evaluation of the types of material used for bile duct drainage tubes // British Journal of Surgery. – 1976. – V. 63. – № 6. – P. 440–445.
78. Araki F., Nakamura H., Nojima N. et al. Stability of recombinant human epidermal growth factor in various solutions. // Chemical & pharmaceutical bulletin. – 1989. – V. 37. – № 2. – P. 404–406.
79. Artel A., Mehdizadeh H., Chiu Y.C. et al. An agent-based model for the investigation of neovascularization within porous scaffolds. // Tissue engineering. Part A. – 2011. – V. 17. – № 17–18. – P. 2133–2141.
80. Assuncao T. De, Jalan-Sakrikar N., Huebert R. Regenerative Medicine and the Biliary Tree // Seminars in Liver Disease. – 2017. – V. 37. – № 01. – P. 017–027.
81. Assuncao T.M., Sun Y., Jalan-Sakrikar N. et al. Development and characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cholangiocytes // Laboratory Investigation. – 2015. – V. 95. – № 6. – P. 684–696.
82. Atala A., Bauer S.B., Soker S. et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. // Lancet. 2006. – V. 367. – № 9518. – P. 1241–1246.
83. Atala A. Regenerative medicine strategies. // Journal of pediatric surgery. – 2012. – V. 47. – № 1. – P. 17–28.
84. Atala A. et al. Engineering complex tissues. // Science translational medicine. – 2012. – V. 4. – №

160. – P. 160rv12.
85. Auger F. A., Gibot L., Lacroix D. The pivotal role of vascularization in tissue engineering //Annual review of biomedical engineering. – 2013. – V. 15. – P. 177-200.
86. Avci-Adali M. Selection and Application of Aptamers and Intramers. // Advances in experimental medicine and biology. – 2016. – V. 917. – P. 241–258.
87. Aydin M., Bakir B., Kösem M. et al. Biliary tract reconstruction with autologous rectus sheath graft--an experimental study. // Hepato-gastroenterology. – 2004. – V. 52. – № 64. – P. 1019–1022.
88. Azevedo H. S., Reis R. L. Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate //Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine. – 2005. – P. 177-201.
89. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds // Annual Review of Biomedical Engineering. – 2011. – V. 13. – P. 27-53.
90. Baker S.C., Rohman G., Southgate J. et al. The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering // Biomaterials. – 2009. – V. 30. – № 7. – P. 1321–1328.
91. Barralet J.E., Wallace L.L., Strain A.J. Tissue engineering of human biliary epithelial cells on polyglycolic acid/polycaprolactone scaffolds maintains long-term phenotypic stability. // Tissue engineering. – 2003. – V. 9. – № 5. – P. 1037–1045.
92. Barrett M., Asbun H.J., Chien H.L. et al. Bile duct injury and morbidity following cholecystectomy: A need for improvement //Surgical endoscopy. – 2018. – V. 32. – №. 4. – P. 1683–1688.
93. Bassols A., Costa C., Eckersall P.D. et al. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. // Proteomics. Clinical applications. – 2014. – V. 8. – № 9–10. – P. 715–731.
94. Bayon Y., Vertès A.A., Ronfard V. et al. Translating cell-based regenerative medicines from research to successful products: challenges and solutions. // Tissue engineering. Part B, Reviews. – 2014. – V. 20. – № 4. – P. 246–256.
95. Behar J. Physiology and Pathophysiology of the Biliary Tract: The Gallbladder and Sphincter of Oddi—A Review // ISRN Physiology. – 2013. – V. 2013. – P. 1–15.
96. Behonick D.J., Werb Z. A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. // Mechanisms of development. – 2003. – V. 120. –№ 11. – P. 1327–1336.
97. Belzer F.O., Watts J.M., Ross H.B. et al. Auto-reconstruction of the common bile duct after venous patch graft. // Annals of surgery. – 1965. – V. 162. – № 3. – P. 346–55.
98. Benias P.C., Wells R.G., Sackey-Aboagye B. et al. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues // Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 4947.
99. Berci G., Shore M., Morgenstern L. et al. Choledochoscopy and operative fluorocholangiography in

the prevention of retained bile duct stones // World Journal of Surgery. – 1978. – V. 2. – № 4. – P. 411–424.
100. Berglundh T., Abrahamsson I., Welander M. et al. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs // Clinical Oral Implants Research. – 2007. – V. 18. – № 1. – P. 1–8.
101. Bergman J.J., Burgemeister L., Bruno M.J. et al. Long-term follow-up after biliary stent placement for postoperative bile duct stenosis // Gastrointestinal Endoscopy. – 2001. – V. 54. – № 2. – P. 154–161.
102. Bettinger C.J.J., Langer R., Borenstein J.T.T. Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function // Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – V. 48. – № 30. – P. 5406–5415.
103. Binkley F.M., Palmer R., Mccorkle H.J. Experimental implantation of the common bile duct into the intestine. // Surgery, gynecology & obstetrics. – 1947. – V. 84. – № 4–A. – P. 697–703.
104. Bitar K.N., Zakhem E. Bioengineering the gut: future prospects of regenerative medicine. // Nature reviews. Gastroenterology & hepatology. – 2016. – V. 13. – № 9. – P. 543–56.
105. Blero D., Huberty V., Devière J. Novel biliary self-expanding metal stents: indications and applications. // Expert review of gastroenterology & hepatology. – 2015. – V. 9. – № 3. – P. 359–367.
106. Boguth L. et al. Malignant biliary obstruction: clinical and histopathologic correlation after treatment with self-expanding metal prostheses. // Radiology. – 1994. – V. 192. – № 3. P. 669–674.
107. Boonstra J. et al. The epidermal growth factor. // Cell biology international. – 1995. – V. 19. – № 5. – P. 413–430.
108. Briggs T., Arinzeh T.L. Examining the formulation of emulsion electrospinning for improving the release of bioactive proteins from electrospun fibers. // Journal of biomedical materials research. Part A. – 2014. – V. 102. – № 3. – P. 674–684.
109. Brown B.N., Londono R, Tottey S. et al. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials // Acta Biomaterialia. – 2012. – V. 8. – № 3. – P. 978–987.
110. Brudenell J.M. Silicone-rubber tubing // The Lancet. – 1954. – V. 263. – № 6810. – P. 517.
111. Brugmans M.C.P. The interplay between biomaterial degradation and tissue properties : relevance for in situ cardiovascular tissue engineering. PhD Thesis. 2015.
112. Brygger C. Investigation of a DNA delivery scaffold via electrospinning of polymer composite nanofibers and prospect for their use as a wound-dressing. PhD Thesis. 2009.
113. Buchwald P., Bodor N. Quantitative Structure−Metabolism Relationships: Steric and Nonsteric Effects in the Enzymatic Hydrolysis of Noncongener Carboxylic Esters // Journal of Medicinal Chemistry. – 1999. – V. 42. – № 25. – P. 5160–5168.
114. Bulanova E.A., Koudan E.V., Degosserie J. et al. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct // Biofabrication. – 2017. – V. 9. – № 3. – P. 034105.

115. Burdick J.A., Vunjak-Novakovic G. Engineered Microenvironments for Controlled Stem Cell Differentiation // Tissue Engineering Part A. – 2009. – V. 15. – № 2. – P. 205–219.
116. Burg K.J., Boland T. Minimally invasive tissue engineering composites and cell printing. // IEEE engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society. – 2003. – V. 22. – № 5. – P. 84–91.
117. Burton R.A., Lee P., Casero R. et al. Three-dimensional histology: tools and application to quantitative assessment of cell-type distribution in rabbit heart. // Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology. – 2014. – V. 16. – № Suppl 4. – P. iv86-iv95.
118. Caddeo S., Boffito M., Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2017. – V.5. – P.1–22.
119. Campbell D.B. Extrapolation from Animals to Man. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1996. – V. 801. – № 1. – P. 116–135.
120. Cantor M.O. Silicone rubber T tubes for common duct drainage // The American Journal of Surgery. – 1964. – V. 107. – № 4. – P. 666–668.
121. Carey S.P., Martin K.E., Reinhart-King C.A. Three-dimensional collagen matrix induces a mechanosensitive invasive epithelial phenotype // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 42088.
122. Carrel A. The surgery of blood vessels etc. // Johns Hopkins Hospital Bulletin. – 1907. – V. 18. – № 190. – P. 18–28.
123. Carroll B. Iatrogenic Bile Duct Injuries // Journal of the American College of Surgeons. – 2017. – V. 224. – № 3. – P. 373.
124. Cebotari S., Lichtenberg A., Tudorache I. et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. // Circulation. – 2006. – V. 114. – № 1 Suppl. – P. I132-7.
125. Champeau D.M., Pineau D.P. Chirurgie des voies biliaires de l'adulte et du nourrisson: technique et tactique. / D.M. Champeau, D.P. Pineau, Paris: Masson & Cie, 1952. 437 p.
126. Chen F.M., Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering // Progress in Polymer Science. – 2016. – V. 53. – P. 86–168.
127. Cheng Y., Lin Y., Xiong X. et al. The human umbilical cord: A novel substitute for reconstruction of the extrahepatic bile duct // Journal of Medical Hypotheses and Ideas. – 2012. – V. 6. – № 1. – P. 7–11.
128. Chistiakov D.A. Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation // Journal of biomedical science. – 2010. – V. 17. – № 1. P. 92.
129. Christopherson G.T., Song H., Mao H.Q. The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation // Biomaterials. – 2009. – V. 30. – № 4. P. 556–564.

130. Chu C.-C. Biodegradable Polymeric Biomaterials: An Updated Overview. C.-C. Chu, eds. CRC Press, 2007. 6-1-6–22 pp.
131. Clark R.A.F. Cutaneous Wound Repair. под ред. L.A. Goldsmith, New York: Oxford University Press, 1991. 576 p.
132. Coons H.G. Self-expanding stainless steel biliary stents. // Radiology. – 1989. – V. 170. – № 3 Pt 2. – P. 979–83.
133. Couet F., Rajan N., Mantovani D. Macromolecular Biomaterials for Scaffold-Based Vascular Tissue Engineering // Macromolecular Bioscience. – 2007. – V. 7. – № 5. – P. 701–718.
134. Cushieri A. et al. Total and subtotal replacement of the common bile duct: effect of transhepatic silicone tube stenting. // Gut. – 1983. – V. 24. – № 8. – P. 756–60.
135. Custódio C.A., Reis R.L., Mano J.F. Engineering Biomolecular Microenvironments for Cell Instructive Biomaterials // Advanced Healthcare Materials. – 2014. – V. 3. – № 6. – P. 797–810.
136. Cyranoski D. Artificial-windpipe surgeon committed misconduct // Nature. – 2015. – V. 521. – № 7553. – P. 406–407.
137. Davis N.F., Callanan A., McGuire B.B. et al. Evaluation of viability and proliferative activity of human urothelial cells cultured onto xenogenic tissue-engineered extracellular matrices. // Urology. – 2011. – V. 77. – № 4. – P. 1007.e1-7.
138. Deaver J.B. Hepatic drainage. // The British Medical Journal. – 1904. – V. 2. – P. 821–825.
139. Deaver J.B. Operation For Removing The Gall-bladder // Annals of surgery. – 1916. – V. 63. – № 4. – P. 415–417.
140. Dekker S.W.A., Hugh T.B. Laparoscopic bile duct injury: understanding the psychology and heuristics of the error // ANZ Journal of Surgery. – 2008. – V. 78. – № 12. – P. 1109–1114.
141. Deltenre P., Valla D.-C. Ischemic Cholangiopathy // Seminars in Liver Disease. – 2008. – V. 28. – № 03. – P. 235–246.
142. Dignass A.U., Tsunekawa S., Podolsky D.K. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration // Gastroenterology. – 1994. – V. 106. – № 5. – P. 1254–1262.
143. Dixon J.S., Gosling J.A. Histochemical and electron microscopic observations on the innervation of the upper segment of the mammalian ureter. // Journal of anatomy. – 1971. – V. 110. – № Pt 1. – P. 57–66.
144. Dobrzański L.A. Overview and general ideas of the development of constructions , materials , technologies and clinical applications of scaffolds engineering for regenerative medicine // Archives of Materials Science and Engineering. – 2014. – V. 69. – № 2. – P. 53–80.
145. Dohmen P.M., Lembcke A., Holinski S. et al. Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. // The Annals of thoracic surgery. – 2011. – V. 92. – № 4. – P. 1308–1314.
146. Doillon C., Dureau G., Clendinnen G. et al. Effects of glycerol pretreatment upon biliary or venous

grafts in bile duct replacement. // Surgery, gynecology & obstetrics. – 1981. – V. 152. – № 5. – P. 613–620.
147. Duller D., Kniepeiss D., Lackner C. et al. Biliary obstruction as a complication of transjugular intrahepatic portosystemic shunt. // Liver transplantation. – 2009. – V. 15. – № 5. – P. 556–557.
148. Dumas J.E., Prieto E.M., Zienkiewicz K.J. et al. Balancing the Rates of New Bone Formation and Polymer Degradation Enhances Healing of Weight-Bearing Allograft/Polyurethane Composites in Rabbit Femoral Defects // Tissue Engineering Part A. – 2014. – V. 20. – № 1–2. – P. 115–129.
149. Dumonceau J.-M., Tringali A., Blero D. et al. Biliary stenting: indications, choice of stents and results: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) clinical guideline. // Endoscopy. – 2012. – V. 44. – № 3. – P. 277–298.
150. Dvir T., Kedem A., Ruvinov E. et al. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2009. – V. 106. – № 35. – P. 14990–14995.
151. Egaña J.T., Fierro F.A., Krüger S. et al. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. // Tissue engineering. Part A. – 2009. – V. 15. – № 5. – P. 1191–200.
152. Ehrmantraut S., Naumann A., Willnecker V. et al. Vitalization of porous polyethylene (Medpor®) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. // Tissue engineering. Part A. – 2012. – V. 18. – № 15–16. – P. 1562–1572.
153. Ellis H., Hoile R.W. Vein patch repair of the common bile duct. // Journal of the Royal Society of Medicine. – 1980. – V. 73. – № 9. – P. 635–627.
154. Enderlen E. Indikation und Ausführung der Gallensteinoperation // Langenbecks Archiv für klinische Chirurgie. – 1923. – V. 126. – P. 264–283.
155. Enoch S., Leaper D.J. Basic science of wound healing // Surgery. – 2008. – V. 26. – № 2. – P. 31–37.
156. Evans M.D.M., Dalton B.A., Steele J.G. Persistent adhesion of epithelial tissue is sensitive to polymer topography // Journal of Biomedical Materials Research. – 1999. – V. 46. – № 4. – P. 485–493.
157. Evaristo-Mendonça F., Carrier-Ruiz A., de Siqueira-Santos R. et al. Dual Contribution of Mesenchymal Stem Cells Employed for Tissue Engineering of Peripheral Nerves: Trophic Activity and Differentiation into Connective-Tissue Cells. // Stem cell reviews. – 2018. – V. 14. – № 2. – P. 200–212.
158. Fauconneau-Dufresne V.A. Précis des maladies du foie et du pancréas. / V.A. Fauconneau-Dufresne, Paris: Librairie Centrale de Napoléon Chaix et Cie, 1860. 488 p.
159. Fedoroff S.P. Einige Richtlinien in der Gallenwegschirurgie. // Deutsche Zeitschrift f. Chirurgie. – 1933. – V. 240. – № 8–10. – P. 695–706.

160. Feller A.M., Riemenschneider T., Küper K. [Microsurgical bile duct anastomosis: animal experiment and clinical study]. // Langenbecks Archiv fur Chirurgie. – 1986. – V. 368. – № 4. – P. 241–248.
161. Flum D.R., Cheadle A., Prela C. et al. Bile duct injury during cholecystectomy and survival in medicare beneficiaries. // Journal of the American Medical Association. – 2003. – V. 290. – № 16. – P. 2168–2173.
162. Ford Versypt A.N., Pack D.W., Braatz R.D. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres — A review // Journal of Controlled Release. – 2013. – V. 165. – № 1. – P. 29–37.
163. Franco D. Towards a bioengineered liver // Journal of Hepatology. – 2014. – V. 60. – № 2. – P. 455–456.
164. Franz S., Rammelt S., Scharnweber D. et al. Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials // Biomaterials. – 2011. – V. 32. – № 28. – P. 6692–6709.
165. Fukushima K., Ueno Y. Bioinformatic approach for understanding the heterogeneity of cholangiocytes // World Journal of Gastroenterology. – 2006. – V. 12. – № 22. – P. 3481–3486.
166. Gagni G., Favaretto P., Luzzani A. et al. [Choledochal prostheses with lyophilized and siliconed dura mater. Experimental research; preliminary results]. // Minerva chirurgica. – 1979. – V. 34. – № 18. – P. 1209–1216.
167. Geng Z.M. et al. Mechanism of benign biliary stricture: A morphological and immunohistochemical study // World Journal of Gastroenterology. – 2005. – V. 11. – № 2. – P. 293–295.
168. Gilmour D., Rembold M., Leptin M. From morphogen to morphogenesis and back // Nature. – 2017. – V. 541. – № 7637. – P. 311–320.
169. Giménez M.E., Palermo M., Houghton E. et al. Biodegradable biliary stents: a new approach for the management of hepaticojejunostomy strictures following bile duct injury. Prospective study. // Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery. – 2016. – V. 29. – № 2. – P. 112–116.
170. Ginsburg N., Speese J. Autogenous Fascial Reconstruction Of The Bile-Duct. // Annals of surgery. – 1917. – V. 65. – № 1. – P. 79–88.
171. Giwa S., Lewis J.K., Alvarez L. et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine // Nature Biotechnology. – 2017. – V. 35. – № 6. – P. 530–542.
172. Gómez N.A., Alvarez L.R., Mite A. et al. Repair of bile duct injuries with Gore-Tex vascular grafts: experimental study in dogs. // Journal of gastrointestinal surgery. – 2002. – V. 6. – № 1. – P. 116–20.
173. Goonoo N. Vascularization and angiogenesis in electrospun tissue engineered constructs: towards the creation of long-term functional networks // Biomedical Physics & Engineering Express. – 2018. –

V. 4. – № 3. – P. 032001.
174. Grabow N., Schmohl K., Khosravi A. et al. Mechanical and structural properties of a novel hybrid heart valve scaffold for tissue engineering. // Artificial organs. – 2004. – V. 28. –№ 11. – P. 971–979.
175. Grolich T., Crha M., Novotný L. et al. Self-expandable biodegradable biliary stents in porcine model. // The Journal of surgical research. – 2015. – V. 193. – № 2. – P. 606–612.
176. Grunewald M., Avraham I., Dor Y. et al. VEGF-Induced Adult Neovascularization: Recruitment, Retention, and Role of Accessory Cells // Cell. – 2006. – V. 124. – № 1. – P. 175–189.
177. Gubareva E.A., Sjöqvist S., Gilevich I.V. et al. Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats // Biomaterials. – 2016. – V. 77. – P. 320–335.
178. Gumargalieva K.Z., Zaikov G.E. Biodegradation and biodeterioration of polymers / K.Z. Gumargalieva, G.E. Zaikov, New York: Nova Science Publishers, 2000. 346 p.
179. Hafezi-Bakhtiari S., Adeyi O.A. Evaluating and interpreting bile duct changes in liver allograft biopsies // Diagnostic Histopathology. – 2012. – V. 18. – № 2. – P. 86–93.
180. Hagiwara K. et al. Resected primary mucinous cholangiocarcinoma of the liver // Surgical Case Reports. – 2018. – V. 4. – № 1. P. 41.
181. Hallenbeck G.A. Biliary and pancreatic intraductal pressures 1967. 1007–1025 p.
182. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxford: Clarendon Press, 1989. 543 p.
183. Hannan R.T., Peirce S.M., Barker T.H. Fibroblasts: Diverse Cells Critical to Biomaterials Integration // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2018. – V. 4. – № 4. – P. 1223–1232.
184. Hardwicke J., Moseley R., Stephens P. et al. Bioresponsive Dextrin−rhEGF Conjugates: *In Vitro* Evaluation in Models Relevant to Its Proposed Use as a Treatment for Chronic Wounds // Molecular Pharmaceutics. – 2010. – V. 7. – № 3. – P. 699–707.
185. Harrell D.B. Basic science of regenerative biology and application to regenerative medicine: Past, present, and future // Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management. – 2015. – V. 19. – № 1–2. – P. 3–9.
186. Hartung H., Kirchner R., Baba N. et al. Histological, laboratory, and x-ray findings after repair of the common bile duct with a Teflon graft // World Journal of Surgery. – 1978. – V. 2. – № 5. – P. 639–642.
187. Hartung H., Sandritter W., Kirchner R. Verwendung von alloplastischem Material an den extrahepatischen Gallenwegen. // Chirurg. – 1976. – V. 47. – № 11. – P. 622–625.
188. Heistermann H.-P., Palmes D., Stratmann U. et al. A new technique for reconstruction of the common bile duct by an autologous vein graft and a biodegradable endoluminal stent. // Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. – 2006. – V. 19. – № 1. – P. 57–60.

189. Heistermann H.P., Palmes D., Hierlemann H. et al. [Reconstruction of bile duct lesions by an autologous vein graft and a bio-degradable endoluminal stent in an animal model: technique and clinical impact]. // Zentralblatt fur Chirurgie. – 2003. – V. 128. – № 11. – P. 952–957.
190. Hench L.L., Polak J.M. Third-Generation Biomedical Materials // Science. – 2002. – V. 295. – № 5557. – P. 1014–1017.
191. Heron M. Deaths: leading causes for 2010. // National vital statistics reports. – 2013. – V. 62. – № 6. – P. 1–96.
192. Holtorf H.L., Jansen J.A., Mikos A.G. Ectopic bone formation in rat marrow stromal cell/titanium fiber mesh scaffold constructs: Effect of initial cell phenotype // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – № 31. – P. 6208–6216.
193. Horsley J.S. Reconstruction of the common bile duct // Journal of the American Medical Association. – 1918. – V. 71. – № 15. – P. 1188–1194.
194. Hu J., Prabhakaran M.P., Ding X. et al. Emulsion electrospinning of polycaprolactone: influence of surfactant type towards the scaffold properties. // Journal of biomaterials science. Polymer edition. – 2015. – V. 26. – № 1. – P. 57–75.
195. Hutmacher D.W., Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering—the rationale to use solid free-form fabrication techniques // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2007. – V. 11. – № 4. – P. 654–669.
196. Iablonskii P., Cebotari S., Tudorache I. et al. Tissue-engineered mitral valve: morphology and biomechanics †. // Interactive cardiovascular and thoracic surgery. – 2015. – V. 20. – № 6. – P. 712–719.
197. Ingber D.E. Reverse Engineering Human Pathophysiology with Organs-on-Chips. // Cell. – 2016. – V. 164. – № 6. – P. 1105–1109.
198. Ismail A., Ramsis R., Sherif A. et al. Use of human amniotic stem cells for common bile duct reconstruction: vascularized support of a free amnion graft. // Medical science monitor. – 2009. – V. 15. – № 9. – P. BR243-R247.
199. Jacobson J.H. Repair and Reconstruction of the Bile Ducts // The American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 1914. – V. 70. – P. 940.
200. Jahani H., Kaviani S., Hassanpour-Ezatti M. et al. The effect of aligned and random electrospun fibrous scaffolds on rat mesenchymal stem cell proliferation. // Cell journal. – 2012. – V. 14. – № 1. – P. 31–38.
201. Jain R.K., Au P., Tam J. et al. Engineering vascularized tissue // Nature Biotechnology. – 2005. – V. 23. – № 7. – P. 821–823.
202. Jang S.I., Lee D.K. Stents with specialized functions: drug-eluting stents and stents with antireflux devices // Gastrointestinal Intervention. – 2015. – V. 4. – № 1. – P. 50–54.

203. Ji W., Sun Y., Yang F. et al. Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications // Pharmaceutical Research. – 2011. – V. 28. – № 6. – P. 1259–1272.
204. Jin H.-J., Fridrikh S.V., Rutledge G.C et al. Electrospinning *Bombyx mori* Silk with Poly(ethylene oxide) // Biomacromolecules. – 2002. – V. 3. – № 6. – P. 1233–1239.
205. Joziasse C.A.P., Grijpma D.W., Bergsma J.E. et al. The influence of morphology on the (hydrolytic degradation of as-polymerized and hot-drawn poly(L-lactide)) // Colloid & Polymer Science. – 1998. – V. 276. – № 11. – P. 968–975.
206. Judd E.S., Burden V.G. Benign stricture of the bile ducts. // Archives of Surgery. – 1925. – V. 11. – № 3. – P. 459–472.
207. Jungebluth P., Alici E., Baiguera S. et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study // The Lancet. – 2011. – V. 378. – № 9808. – P. 1997–2004.
208. Justin A.W., Saeb-Parsy K., Markaki A.E. et al. Advances in the generation of bioengineered bile ducts. // Biochimica et biophysica acta. – 2018. – V. 1864. – № 4 Pt B. – P. 1532–1538.
209. Kabanov A. V, Kabanov V.A. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. // Bioconjugate chemistry. – 1995. – V. 6. – № 1. – P. 7–20.
210. Kahaleh M., Brijbassie A., Sethi A. et al. Multicenter trial evaluating the use of covered self-expanding metal stents in benign biliary strictures: time to revisit our therapeutic options? // Journal of Clinical Gastroenterology. – 2013. – V. 47. – № 8. – P. 695–699.
211. Karaayvaz M., Uğraş S., Güler O. et al. Use of an autologous vein graft and stent in the repair of common bile defects: an experimental study. // Surgery today. – 1998. – V. 28. – № 8. – P. 830–833.
212. Kehr H. Zur Chirurgie der Gallensteinkrankheit // Deutsche Zeitschrift für Chirurgie. – 1894. – V. 38. – № 4–5. – P. 321–399.
213. Kenawy E.-R., Bowlin G.L., Mansfield K. et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend // Journal of Controlled Release. – 2002. – V. 81. – № 1–2. – P. 57–64.
214. Keplinger K.M., Bloomston M. Anatomy and embryology of the biliary tract. // The Surgical clinics of North America. – 2014. – V. 94. – № 2. – P. 203–217.
215. Khan Y., Yaszemski M.J., Mikos A.G. et al. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. // The Journal of bone and joint surgery. American volume. – 2008. – V. 90. – № Suppl 1. – P. 36–42.
216. Kida M., Miyazawa S., Iwai T. et al. Recent advances of biliary stent management. // Korean journal of radiology. – 2012. – V. 13. – № Suppl 1. – P. S62-S66.
217. Kiel C., Yus E., Serrano L. Engineering signal transduction pathways //Cell. – 2010. – V. 140. –

№. 1. – P. 33-47.
218. Kinstlinger I. S., Miller J. S. 3D-printed fluidic networks as vasculature for engineered tissue //Lab on a Chip. – 2016. – V. 16. – №. 11. – P. 2025-2043.
219. Kirchner R., Hartung H., Oswald A. et al. [Patch widening technic of benign bile duct stenosis in dogs using teflon and Solco grafts]. // Chirurgisches Forum fur experimentelle und klinische Forschung. – 1978. – № 1978. – P. 173–176.
220. Kirchner R. [The surgical treatment of benign bile duct stenoses]. // Fortschritte der Medizin. – 1980. – V. 98. – № 17. – P. 643–648.
221. Kirtley Jr J.A. Problems in common duct surgery for nonmalignant diseases. // Current Problems in Surgery. – 1964. – V. 1. – № 12. – P. 1–51.
222. Kishi Y., Imamura H., Sugawara Y. et al. Evaluation of donor vasculobiliary anatomic variations in liver graft procurements // Surgery. – 2010. – V. 147. – № 1. – P. 30–39.
223. Kosorn W., Thavornyutikarn B., Uppanan P. Surface modification of polycaprolactone scaffolds by plasma treatment for chondrocyte culture. Singapore: IACSIT Press, Singapore, 2012. 44–48 c.
224. la Puente P., Muz B., Gilson R.C. et al. 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. // Biomaterials. – 2015. – V. 73. – P. 70–84.
225. Lahey F.H., Pyrtek L.J. Experience with the operative management of 280 strictures of the bile ducts, with a description of a new method and a complete follow-up study of the end results in 229 of the cases. // Surg Gynecol Obstet. – 1950. – V. 91. – № 1. – P. 25–56.
226. Lam C.X., Savalani M.M., Teoh S.H. et al. Dynamics of *in vitro* polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions // Biomedical Materials. – 2008. – V. 3. – № 3. – P. 034108.
227. Lan C.-W., Wang F.F., Wang Y.J. Osteogenic enrichment of bone-marrow stromal cells with the use of flow chamber and type I collagen-coated surface // Journal of biomedical materials research. Part A. – 2003. – V. 66. – № 1. – P. 38–46.
228. Landers R., Pfister A., Hübner U. et al. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques // Journal of Materials Science. – 2002. – V. 37. – № 15. – P. 3107–3116.
229. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering. // Science. – 1993. – V. 260. – № 5110. – P. 920–926.
230. Lau W.Y., Lai E.C.H., Lau S.H.Y. Management of bile duct injury after laparoscopic cholecystectomy: A review // ANZ Journal of Surgery. – 2010. – V. 80. – № 1–2. – P. 75–81.
231. Laurence B.H., Cotton P.B. Decompression of malignant biliary obstruction by duodenoscopic intubation of bile duct. // British medical journal. – 1980. – V. 280. – № 6213. – P. 522–523.
232. Leary H.J., Kelley G.E., Michaels W.J. The use of preserved bile duct homografts to bridge

common duct defects; experimental study. // Surgery. – 1953. – V. 34. – № 2. – P. 238–244.
233. Lei L. et al. Stents as a platform for drug delivery // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2011. – V. 8. – № 6. – P. 813–831.
234. Lendoire J. Commentary: Operative Repair of Common Bile Duct Injury. Cham: Springer International Publishing, 2015. 333–336 c.
235. Li Q., Tao L., Chen B. et al. Extrahepatic bile duct regeneration in pigs using collagen scaffolds loaded with human collagen-binding bFGF. // Biomaterials. – 2012. – V. 33. – № 17. – P. 4298–308.
236. Li W.J., Laurencin C.T., Caterson E.J. et al. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering // Journal of biomedical materials research. – 2002. – V. 60. – № 4. – P. 613–21.
237. Li W.C., Zhang H.M., Li J. et al. Comparison of biomechanical properties of bile duct between pigs and humans for liver xenotransplant. // Transplantation proceedings. – 2013. – V. 45. – № 2. – P. 741–747.
238. Liang J., Balachandra S., Ngo S. et al. Feedback regulation of steady-state epithelial turnover and organ size // Nature. – 2017. – V. 548. – № 7669. – P. 588–591.
239. Lillemoe K.D. Benign post-operative bile duct strictures // Baillière’s Clinical Gastroenterology. – 1997. – V. 11. – № 4. – P. 749–779.
240. Lin C.-C., Anseth K.S. The Biodegradation of Biodegradable Polymeric Biomaterials Elsevier, 2013. 716–728 pp.
241. Lin Y.-Q., Wang L.R., Pan L.L. et al. Kidney bioengineering in regenerative medicine: An emerging therapy for kidney disease. // Cytotherapy. – 2016. – V. 18. – № 2. – P. 186–197.
242. Liu X., Ma P.X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering // Annals of Biomedical Engineering. – 2004. – V. 32. – № 3. – P. 477–486.
243. Liu Y. et al. Urethral reconstruction with autologous urine-derived stem cells seeded in three-dimensional porous small intestinal submucosa in a rabbit model. // Stem cell research & therapy. – 2017. – V. 8. – № 1. – P. 63.
244. Lu L., Peter S.J., Lyman M.D. et al. In vitro and in vivo degradation of porous poly(dl-lactic-co-glycolic acid) foams // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – № 18. – P. 1837–1845.
245. Luo T., Mohan K., Iglesias P.A. et al. Molecular mechanisms of cellular mechanosensing. // Nature materials. – 2013. – V. 12. – № 11. – P. 1064–1071.
246. Luu Y.K., Kim K., Hsiao B.S. et al. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. // Journal of controlled release. – 2003. – V. 89. – № 2. – P. 341–353.
247. Mano J.F. Designing biomaterials for tissue engineering based on the deconstruction of the native cellular environment // Materials Letters. – 2015. – V. 141. – P. 198–202.
248. Marcacci M., Kon E., Moukhachev V. et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics

for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. // Tissue engineering. – 2007. – V. 13. – № 5. – P. 947–955.
249. Mashinchian O., Bonakdar S., Taghinejad H. et al. Cell-Imprinted Substrates Act as an Artificial Niche for Skin Regeneration // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2014. – V. 6. – № 15. – P. 13280–13292.
250. Matsuda Y. [A comparative electron microscope study on the fine structure of the muscular coat in the common bile duct]. // Fukuoka igaku zasshi = Hukuoka acta medica. – 1991. – V. 82. – № 6. – P. 362–369.
251. Matta R., Davies J.E. Bioengineering and Regenerative Medicine in Surgery / R. Matta, J.E. Davies, 2016 by R. Matta and J.E. Davies. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved, 2016. 189-203 pp.
252. Maksimova N., Krasheninnikov M., Zhang Y. et al. Early passage autologous mesenchymal stromal cells accelerate diabetic wound re-epithelialization: A clinical case study //Cytotherapy. – 2017. – V. 19. – №. 12. – P. 1548-1550.
253. Mayo W.J. Some Remarks on Cases involving Operative Loss of Continuity of the Common Bile Duct: With the Report of a Case of Anastomosis Between the Hepatic Duct and the Duodenum. // Annals of surgery. – 1905. – V. 42. – № 1. – P. 90–96.
254. McKee C.T., Last J.A., Russell P. et al. Indentation Versus Tensile Measurements of Young's Modulus for Soft Biological Tissues // Tissue Engineering Part B: Reviews. 2011. – V. 17. – № 3. – P. 155–164.
255. McPartland K.J., Pomposelli J.J. Iatrogenic biliary injuries: classification, identification, and management // The Surgical clinics of North America. – 2008. – V. 88. – № 6. – P. 1329–43.
256. Mendelowitz D.S., Beal J.M. Expanded polytetrafluoroethylene in reconstruction of the canine biliary system. // American journal of surgery. – 1982. – V. 143. – № 2. – P. 221–224.
257. Miyazawa M. et al. A tissue-engineered artificial bile duct grown to resemble the native bile duct. // American journal of transplantation. 2005. – V. 5. – № 6. – P. 1541–1547.
258. Mo X.M. et al. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – № 10. – P. 1883–1890.
259. Molineus G. Über die Möglichkeit eines Choledochusersatzes durch Einpflanzen des Processus vermiformis. // Deutsche Zeitschrift für Chirurgie. – 1913. – V. 121. – P. 447.
260. Montalvo-Javé E.E. et al. Absorbable bioprosthesis for the treatment of bile duct injury in an experimental model // International Journal of Surgery. – 2015. – V. 20. – P. 163–169.
261. Moore M.D., McIntyre C.A., Eachempati S. Management of Complications from Biliary Surgery. Cham: Springer International Publishing, 2017. 253–261 c.
262. Morell C.M., Fabris L., Strazzabosco M. Vascular biology of the biliary epithelium. // Journal of gastroenterology and hepatology. – 2013. – V. 28 Suppl 1. – P. 26–32.

263. Morille M., Cattalini J.P., Roether J.A. et al. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer // Biomaterials. – 2008. – V. 29. – № 24–25. – P. 3477–3496.
264. Mouriño V. et al. Composite polymer-bioceramic scaffolds with drug delivery capability for bone tissue engineering // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2013. – V. 10. – № 10. – P. 1353–1365.
265. Muto Y., Eguchi H., Miyazaki T. et al. Modified vein allograft for small arterial reconstruction in dogs // The Japanese Journal of Surgery. – 1986. – V. 16. – № 3. – P. 225–230.
266. Myers R. Histological, laboratory, and X-ray findings after repair of the common bile duct with a Teflon graft. Invited commentary. // World journal of surgery. – 1978. – V. 2. – № 5. – P. 643–644.
267. Nakashima S. et al. In situ tissue engineering of the bile duct using polypropylene mesh-collagen tubes. // The International journal of artificial organs. – 2007. – V. 30. – № 1. – P. 75–85.
268. Nakokhov R.Z. et al. Angiogenesis mechanisms in transplantation of tissue-engineered constructions // Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. – 2017. – V. 19. – № 4. – P. 141–145.
269. Nau P. et al. Novel reconstruction of the extrahepatic biliary tree with a biosynthetic absorbable graft // HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association. – 2011. – V. 13. – № 8. – P. 573–578.
270. Neto J.S., Nakao A., Kimizuka K. et al. Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide // American Journal of Physiology-Renal Physiology. – 2004. – V. 287. – № 5. – P. F979–F989.
271. Nezarati R.M., Eifert M.B., Dempsey D.K. et al. Electrospun vascular grafts with improved compliance matching to native vessels // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2015. – V. 103. – № 2. – P. 313–323.
272. Northover J.M.A., Terblanche J. A new look at the arterial supply of the bile duct in man and its surgical implications // British Journal of Surgery. – 1979. – V. 66. – № 6. – P. 379–384.
273. Northover J.M.A., Terblanche J. Applied surgical anatomy of the biliary tree. // Clinical Surgery International. – 1982. – V. 5. – P. 1–16.
274. Nyberg E. et al. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering // Drug Delivery and Translational Research. – 2016. – V. 6. – № 2. – P. 184–194.
275. Oliveira J.M., Mano J.F., Ohgushi H. et al. Protocol of Osteogenesis from BMSC Cultured with Dexamethasone-Loaded Dendrimer Nanoparticles onto Ceramic and Polymeric Scaffolds: In Vivo Studies. In: A Manual for Differentiation of Bone Marrow-derived Stem Cells to Specific Cell Types. – 2014. P. 67–74.
276. Oliveira S.M., Reis R.L., Mano J.F. Towards the design of 3D multiscale instructive tissue engineering constructs: Current approaches and trends // Biotechnology Advances. – 2015. – V. 33. – № 6. – P. 842–855.

277. Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. // Nature medicine. 2008. – V. 14. – № 2. – P. 213–221.
278. Owen S.C., Shoichet M.S. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds //Journal of biomedical materials research Part A. – 2010. – V. 94. – №. 4. – С. 1321-1331.
279. Palmes D., Wolters H., Spiegel H.U. et al. Morphological changes during creation of a neo-bile duct using a vein and a biodegradable endoluminal stent // Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. – 2009. – V. 22 – № 6. – P. 435–44.
280. Park H.-J., Yang F., Cho S.-W. Nonviral delivery of genetic medicine for therapeutic angiogenesis. // Advanced drug delivery reviews. – 2012. – V. 64. – № 1. – P. 40–52.
281. Pasquali S.K., Hasselblad V., Li J.S. et al. Coronary artery pattern and outcome of arterial switch operation for transposition of the great arteries: a meta-analysis. // Circulation. – 2002. – V. 106. – № 20. – P. 2575–2580.
282. Pastorino L., Pioli F., Zilli M. et al. Lipase-catalyzed degradation of poly(ε-caprolactone) // Enzyme and Microbial Technology. – 2004. – V. 35. – № 4. – P. 321–326.
283. Pedde R.D., Mirani B., Navaei A. et al. Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs // Advanced Materials. – 2017. – V. 29. – № 19. – P. 1606061.
284. Pekolj J., Alvarez F.A., Palavecino M. et al. Intraoperative management and repair of bile duct injuries sustained during 10,123 laparoscopic cholecystectomies in a high-volume referral center // Journal of the American College of Surgeons. – 2013. – V. 216. – № 5. – P. 894–901.
285. Peltola S.M., Melchels F.P., Grijpma D.W. et al. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. // Annals of medicine. – 2008. – V. 40. – № 4. – P. 268–80.
286. Peng H., Ling J., Liu J. et al. Controlled enzymatic degradation of poly(ε-caprolactone)-based copolymers in the presence of porcine pancreatic lipase // Polymer Degradation and Stability. – 2010. – V. 95. – № 4. – P. 643–650.
287. Pérez Alonso A.J., del Olmo Rivas C., Romero I.M. et al. [Bile duct reconstruction using 3-dimensional collagen tubes]. // Cirugía española. – 2013. – V. 91. – № 9. – P. 590–594.
288. Petit F., Minns A.B., Dubernard J.M. et al. Composite tissue allotransplantation and reconstructive surgery: first clinical applications. // Annals of surgery. – 2003. – V. 237. – № 1. – P. 19–25.
289. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. // Tissue engineering. – 2006. – V. 12. – № 5. – P. 1197–1211.
290. Picollet-D'hahan N., Dolega M.E., Liguori L. et al. A 3D Toolbox to Enhance Physiological Relevance of Human Tissue Models // Trends in Biotechnology. – 2016. – V. 34. – № 9. – P. 757–769.
291. Pitt C.G., Gratzl M.M., Kimmel G.L. et al. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. // Biomaterials. – 1981. – V. 2. – № 4. – P. 215–20.

292. Pollard H. et al. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. // The Journal of biological chemistry. – 1998. – V. 273. – № 13. – P. 7507–7511.
293. Praderi R. et al. [Double orifice transhepatic drainage]. // La Nouvelle presse medicale. – 1974. – V. 3. – № 32. – P. 2015–2018.
294. Pramanik S., Kar K.K. Functionalized poly(ether ether ketone): Improved mechanical property and acellular bioactivity // Journal of Applied Polymer Science. – 2012. – V. 123. – № 2. – P. 1100–1111.
295. Price R.L., Gutwein L.G., Kaledin L. et al. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. // Journal of biomedical materials research. Part A. – 2003. – V. 67. – № 4. – P. 1284–1293.
296. Prockop D.J., Oh J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. // Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. – 2012. – V. 20. – № 1. – P. 14–20.
297. Propping K. Regenerierung des Choledochus nach Einlegen eines T-Rohres. // Beiträge z. klin. Chir. – 1913. – V. 83. – P. 369.
298. Qutub A.A., Mac Gabhann F., Karagiannis E.D. et al. Multiscale models of angiogenesis // IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. – 2009. – V. 28. – № 2. – P. 14–31.
299. Raya-Rivera A., Esquiliano D.R., Yoo J.J. et al. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. // Lancet. – 2011. – V. 377. – № 9772. – P. 1175–1182.
300. Ren W., Shi D. [Experimental study on repair of bile duct defects with expanded polytetrafluoroethylene]. // Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery. – 2001. – V. 15. – № 5. – P. 305–307.
301. Rey J.F., Dumas R., Canard J.M. et al. Guidelines of the French Society of Digestive Endoscopy: biliary stenting. // Endoscopy. – 2002. – V. 34. – № 2. – P. 169–173, 181–185.
302. Rosen M., Ponsky J., Petras R. et al. Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration // Surgery. – 2002. – V. 132. – № 3. – P. 480–486.
303. Ross D.T. Structured analysis (SA): A language for communicating ideas. // IEEE Transactions on software engineering. – 1977. – № 1. – P. 16–34.
304. Rosso F., Marino G., Giordano A. et al. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. // Journal of cellular physiology. – 2005. – V. 203. – № 3. – P. 465–70.
305. Rubenstein D.A., Venkitachalam S.M., Zamfir D. et al. In vitro biocompatibility of sheath-core cellulose-acetate-based electrospun scaffolds towards endothelial cells and platelets. // Journal of biomaterials science. Polymer edition. – 2010. – V. 21. – № 13. – P. 1713–1736.
306. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A. et al. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel

maturation. // Tissue engineering. Part A. – 2009. – V. 15. – № 8. – P. 2039–2050.
307. Ruka M., Rowinski W.A., Lipski M. et al. Expanded polytetrafluoroethylene grafts in restoring bile drainage in dogs. // Zeitschrift fur experimentelle Chirurgie, Transplantation, und kunstliche Organe : Organ der Sektion Experimentelle Chirurgie der Gesellschaft fur Chirurgie der DDR. – 1987. – V. 20. – № 6. – P. 317–323.
308. Rutledge R.H. Methods of repair of noncircumferential bile duct defects. // Surgery. – 1983. – V. 93. – №2. – P. 333–342.
309. Rystedt J.M.L., Montgomery A.K. Quality-of-life after bile duct injury: intraoperative detection is crucial. A national case-control study // HPB. – 2016. – V. 18. – № 12. – P. 1010–1016.
310. Sachlos E., Czernuszka J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. // European Cells and Materials. – 2003. – V. 5. – P. 29-39; discussion 39-40.
311. Sachs P.C., Mollica P.A., Bruno R.D. Tissue specific microenvironments: a key tool for tissue engineering and regenerative medicine // Journal of Biological Engineering. – 2017. – V. 11. – № 1. – P. 34.
312. Safaeijavan R., Soleimani M., Divsalar A. et al. Biological behavior study of gelatin coated PCL nanofiberous electrospun scaffolds using fibroblasts. // Journal of Paramedical Sciences (JPS) Winter. – 2014. – V. 5. – № 1. – P. 67–73.
313. Salim A.S. Choledochoplasty by Vein Grafts in Iatrogenic Bile Duct Injuries // HPB Surgery. – 1992. – V. 5. – № 3. – P. 195–202.
314. Samuel P.S. et al. Ligament regenerative engineering. Taylor & Francis Group, 2013. 331–359 pp.
315. Sanislow C.A., Zuidema G.D. The use of silicone T-tubes in reconstructive biliary surgery in dogs // Journal of Surgical Research. – 1963. – V. 3. – № 10. – P. 497–502.
316. Santibáñes E. De, Ardiles V., Pekolj J. Complex bile duct injuries: management // HPB. – 2008. – V. 10. – № 1. – P. 4–12.
317. Santos M., Smith M.L., Hughes C.W. et al. Reconstruction of the bile ducts: an experimental study using free arterial grafts and nylon mesh tubes. // Surgery. – 1957. – V. 42. – № 3. – P. 462–73.
318. Sasaki H., Fukuda S., Otani H. et al. Hypoxic Preconditioning Triggers Myocardial Angiogenesis: a Novel Approach to Enhance Contractile Functional Reserve in Rat with Myocardial Infarction // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2002. – V. 34. – № 3. – P. 335–348.
319. Savostyanov G.A., Grefner N.M., Savostyanova E.G. Simulation and Reconstruction of 3-D Epithelial Structure. 3-D Structural Histology. St. Petersburg, Russia, 2007.
320. Schenke-Layland K., Walles H. Strategies in tissue engineering and regenerative medicine // Biotechnology Journal. – 2013. – V. 8. – № 3. – P. 278–9.
321. Schumann P., Tavassol F., Lindhorst D. et al. Consequences of seeded cell type on vascularization

of tissue engineering constructs in vivo // Microvascular Research. – 2009. – V. 78. – № 2. – P. 180–190.
322. Sedgwick C.E. Reconstruction of the common bile duct with a free ureteral graft; an experimental study. // Surgery, gynecology & obstetrics. – 1951. – V. 92. – № 5. – P. 571–573.
323. Selvakumar R., Bhattacharyya A., Gopinathan J. et al. Functionalization of scaffolds with biomolecules for various types of tissue engineering applications. CRC Press, 2016. 391–433 pp.
324. Sevostyanova V.V., Antonova L.V., Velikanova E.A. et al. Endothelialization of Polycaprolactone Vascular Graft under the Action of Locally Applied Vascular Endothelial Growth Factor. // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2018. – V. 165. – № 2. – P. 264–268.
325. Sezgin B., Ozmen S., Bulam H. et al. Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling // Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. – 2014. – V. 67. – № 5. – P. 712–720.
326. Shapiro A.L., Robillard G.L. The arterial blood supply of the common and hepatic bile ducts with reference to the problems of common duct injury and repair; based on a series of 23 dissections. // Surgery. – 1948. – V. 23. – № 1. – P. 1–11.
327. Sharma B., Elisseeff J.H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. // Annals of biomedical engineering. – 2004. – V. 32. – № 1. – P. 148–59.
328. Jin S., Shi X., Sun X. et al. Research progress on artificial bile duct // Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery. – 2014. – V. 20. – № 10. – P. 761–765.
329. Siepmann J., Göpferich A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2001. – V. 48. – № 2–3. – P. 229–247.
330. Sill T.J., Recum H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. // Biomaterials. – 2008. – V. 29. – № 13. – P. 1989–2006.
331. Simón-Yarza T., Formiga F.R., Tamayo E. et al. Vascular Endothelial Growth Factor-Delivery Systems for Cardiac Repair: An Overview // Theranostics. – 2012. – V. 2. – № 6. – P. 541–552.
332. Siparsky G.L., Voorhees K.J., Miao F. Hydrolysis of Polylactic Acid (PLA) and Polycaprolactone (PCL) in Aqueous Acetonitrile Solutions: Autocatalysis // Journal of Polymers and the Environment. – 1998. – V. 6. – № 1. – P. 31–41.
333. Sisić F., Hamamdzić M., Krnić J. et al. [Early prognosis of free venous autograft in common bile duct reconstruction. Experimental study--first phase]. // Acta chirurgica Iugoslavica. – 1990. – V. 37. – № 2. – P. 167–180.
334. Soehendra N., Reynders-Frederix V. Palliative bile duct drainage - a new endoscopic method of introducing a transpapillary drain. // Endoscopy. – 1980. – V. 12. – № 1. – P. 8–11.
335. Soliman S., Laurent J., Kalenjian L. et al. A multilayer scaffold design with spatial arrangement of cells to modulate esophageal tissue growth // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied

Biomaterials. – 2018.
336. Song J.J., Ott H.C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. // Trends in molecular medicine. – 2011. – V. 17. – № 8. – P. 424–32.
337. Soroka C.J., Alrabadi L., Mennone A. et al. Human bile contains stem cells which can be cultured in vitro as 3D organoids. // Hepatology. – 2017. – V. 66. – № 1. – P. 64A–64A.
338. Spyrou L.A. Muscle and tendon tissues: constitutive modeling, numerical implementation and applications 2009.
339. Stanković M., Hiemstra C., de Waard H. et al. Protein release from water-swellable poly(D,L-lactide-PEG)-b-poly(ϵ-caprolactone) implants. // International journal of pharmaceutics. – 2015. – V. 480. – № 1–2. – P. 73–83.
340. Stannard A., Brown K., Benson C. et al. Outcome after vascular trauma in a deployed military trauma system. // The British journal of surgery. – 2011. – V. 98. – № 2. – P. 228–234.
341. Stelling J. et al. Robustness of Cellular Functions // Cell. – 2004. – V. 118. – № 6. – P. 675–685.
342. Stempien-Otero A., Helterline D., Plummer T. et al. Mechanisms of Bone Marrow−Derived Cell Therapy in Ischemic Cardiomyopathy With Left Ventricular Assist Device Bridge to Transplant // Journal of the American College of Cardiology. – 2015. – V. 65. – № 14. – P. 1424–1434.
343. Stephens F.O., Dunphy J.E. Grafts of the common bile duct. An historical review. // The Australian and New Zealand journal of surgery. – 1963. – V. 33. – № 1. – P. 53–57.
344. Stevens M.M., George J.H. Exploring and engineering the cell surface interface. // Science. – 2005. – V. 310. – № 5751. – P. 1135–1138.
345. Stewart L. Iatrogenic biliary injuries: identification, classification, and management // Surgical Clinics of North America. – 2014. – V. 94. – № 2. – P. 297–310.
346. Stollar B.D. The origin and pathogenic role of anti-DNA autoantibodies // Current Opinion in Immunology. – 1990. – V. 2. – № 4. – P. 607–612.
347. Strazzabosco M., Fabris L. Functional anatomy of normal bile ducts // Anatomical record. – 2008. – V. 291. – № 6. – P. 653–60.
348. Stropeni L., Giordano G. Ersatz des Choledochus durch ein frei transplantiertes Venenstück // Zentralblatt für Chirurgie. – 1914. – № 41. – P. 190–191.
349. Struecker B., Hillebrandt K.H., Raschzok N. et al. Implantation of a Tissue-Engineered Neo-Bile Duct in Domestic Pigs // European Surgical Research. – 2015. – V. 56. – № 1–2. – P. 61–75.
350. Su N. et al. Fibrous scaffolds potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells: A new dimension in cell-material interaction. // Biomaterials. – 2017. – V. 141. – P. 74–85.
351. Suda T., Liu D. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications // Molecular Therapy. – 2007. – V. 15. – № 12. – P. 2063–2069.
352. Sullivan A.G. Reconstruction of the Bile Ducts // Journal of the American Medical Association. –

1909. – V. 53. – № 10. – P. 774–777.
353. Sung H.J., Meredith C., Johnson C. et al. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – № 26. – P. 5735–5742.
354. Susa J.B. Methodology for the Study of Metabolism: Animal Models New York, NY: Springer US, 1991. 48–60 pp.
355. Takebe T., Sekine K., Enomura M. et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant // Nature. – 2013. – V. 499. – № 7459. – P. 481–484.
356. Tao L., Li Q., Ren H. et al. Repair of Extrahepatic Bile Duct Defect Using a Collagen Patch in a Swine Model // Artificial Organs. – 2015. – V. 39. – № 4. – P. 352–360.
357. Tashiro H., Ogawa T., Itamoto T. et al. Synthetic Bioabsorbable Stent Material for Duct-to-Duct Biliary Reconstruction // Journal of Surgical Research. – 2009. – V. 151. – № 1. – P. 85–88.
358. Tavassol F., Schumann P., Lindhorst D. et al. Accelerated angiogenic host tissue response to poly(L-lactide-co-glycolide) scaffolds by vitalization with osteoblast-like cells. // Tissue engineering. Part A. – 2010. – V. 16. – № 7. – P. 2265–2279.
359. Teebken, Puschmann, Rohde et al. Human iliac vein replacement with a tissue-engineered graft // Vasa. – 2009. – V. 38. – № 1. – P. 60–65.
360. Teixeira A.I., Abrams G. A., Bertics P. J. et al. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. // Journal of cell science. – 2003. – V. 116. – № Pt 10. – P. 1881–1892.
361. Thomas J.P., Metropol H.J., Myers R.T. Teflon patch graft for reconstruction of the extrahepatic bile ducts. // Annals of surgery. – 1964. – V. 160. – P. 967–70.
362. Thompson C.M., Saad N.E., Quazi R.R. et al. Management of Iatrogenic Bile Duct Injuries: Role of the Interventional Radiologist // RadioGraphics. – 2013. – V. 33. – № 1. – P. 117–134.
363. Traversa E., Mecheri B., Mandoli C. et al. Tuning hierarchical architecture of 3D polymeric scaffolds for cardiac tissue engineering // Journal of Experimental Nanoscience. – 2008. – V. 3. – № 2. – P. 97–110.
364. Türker Şener L., Albeniz G., Dinç B. et al. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. // Experimental and therapeutic medicine. – 2017. – V. 14. – № 3. – P. 1866–1870.
365. Uth N., Mueller J., Smucker B. et al. Validation of scaffold design optimization in bone tissue engineering: finite element modeling versus designed experiments // Biofabrication. – 2017. – V. 9. – № 1. – P. 015023.
366. Vacanti J.P., Kulig K.M. Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation // Seminars in Pediatric Surgery. – 2014. – V. 23. – № 3. – P. 150–155.
367. Velasco M.A., Narváez-Tovar C.A., Garzón-Alvarado D.A. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. // BioMed research

international. – 2015. – V. 2015. – P. 729076.
368. Velazquez J.J., Su E., Cahan P. et al. Programming Morphogenesis through Systems and Synthetic Biology // Trends in Biotechnology. – 2018. – V. 36. – № 4. – P. 415–429.
369. Virchow R. Cellular-Pathologie // Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin. – 1855. – V. 8. – № 1. – P. 3–39.
370. Vojtaššák J., Poruban D., Bakoš D. et al. Mouth cavity base defect treated with biosynthetic graft // Biologia. – 2006. – V. 61. – № 6. – P. 713–718.
371. Volkman R. Beitrage zur chirurgie. Leipzig: Breitkopf und Hartel, 1875. – 388 pp.
372. Volkmann R. Die ischaemischen muskellamungen and kontraktunen. // Centralbl. f. Chirurg. – 1881. – V. 51. – P. 801.
373. Wang S., Kempen D.H., De Ruiter G.C. et al. Molecularly Engineered Biodegradable Polymer Networks with a Wide Range of Stiffness for Bone and Peripheral Nerve Regeneration // Advanced Functional Materials. – 2015. – V. 25. – № 18. – P. 2715–2724.
374. Warren K.W., Mcdonald W.M. Facts and fiction regarding strictures of the extrahepatic bile ducts. // Annals of surgery. – 1964. – V. 159. – № 6. – P. 996–1010.
375. Webber M.J., Appel E.A., Meijer E.W. et al. Supramolecular biomaterials // Nature Materials. – 2016. – V. 15. – № 1. – P. 13–26.
376. Wesolowski S.A., Martinez A., McMahon J.D. Use of artificial materials in surgery // Current Problems in Surgery. – 1966. – V. 3. – № 12. – P. 1–86.
377. Whited B.M., Rylander M.N. The influence of electrospun scaffold topography on endothelial cell morphology, alignment, and adhesion in response to fluid flow // Biotechnology and Bioengineering. – 2014. – V. 111. – № 1. – P. 184–195.
378. Wilms M. Reconstruction of the Bile Ducts. // Journal of the American Medical Association. – 1909. – V. 53. – P. 774–777.
379. Winstone N. E., Lawson L.J., Golby M.G.S. et al. Biliary peritonitis: a hazard of polyvinyl chloride T-tubes // The Lancet. – 1965. – V. 285. – №. 7390. – C. 843-844.
380. Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century // Progress in Polymer Science. – 2010. – V. 35. – № 10. – P. 1217–1256.
381. Wu Y., Zhao R. C. H., Tredget E. E. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration //Stem cells. – 2010. – V. 28. – №. 5. – C. 905-915.
382. Xia H., Li X., Gao W. et al. Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells // Nature Reviews Materials. – 2018. – V. 3. – № 7. – P. 174–193.
383. Xu C., Inai R., Kotaki M. et al. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. // Tissue engineering. – 2004. – V. 10. – № 7–8. – P. 1160–1168.

384. Yamamoto K., Yoshioka T., Furuichi K. et al. Experimental study of poly-L-lactic acid biodegradable stents in normal canine bile ducts. // Cardiovascular and interventional radiology. – 2011. – V. 34. – № 3. – P. 601–608.
385. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Margasyuk D.V. et al. Effect of adhesion on the status of corneal tissue during in vitro culturing // Biology Bulletin. – 2009. – V. 36. – № 1. – P. 6–11.
386. Yan J., Qiang L., Gao Y. et al. Effect of fiber alignment in electrospun scaffolds on keratocytes and corneal epithelial cells behavior // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2012. – V. 100A. – № 2. – P. 527–535.
387. Yoo D. New paradigms in internal architecture design and freeform fabrication of tissue engineering porous scaffolds // Medical Engineering & Physics. – 2012. – V. 34. – № 6. – P. 762–776.
388. Yuan S., Kevil C.G. Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Regulation of Ischemic Vascular Remodeling // Microcirculation. – 2016. – V. 23. – № 2. – P. 134–145.
389. Zeng J., Xu X., Chen X. et al. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. // Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. – 2003. – V. 92. – № 3. – P. 227–231.
390. Zhang G., Gao X., Song Y.K. et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. // Gene therapy. – 2004. – V. 11. – № 8. – P. 675–682.
391. Zhang H., Jia X., Han F. et al. Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. // Biomaterials. – 2013. – V. 34. – № 9. – P. 2202–2212.
392. Zhou J., Zhao Y., Wang J. et al. Therapeutic Angiogenesis Using Basic Fibroblast Growth Factor in Combination with a Collagen Matrix in Chronic Hindlimb Ischemia // The Scientific World Journal. – 2012. – V. 2012. – P. 1–8.
393. Zimmer V., Lammert F. Genetics in liver disease: new concepts // Current Opinion in Gastroenterology. – 2011. – V. 27. – № 3. – P. 231–239.
394. Zolotorevskii V.Y., Vishnevskii V.A., Savvina T.V. Survival of venous patches autografted into the common bile duct in dogs // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 1986. – V. 101. – № 4. – P. 547–549.
395. Zong C., Wang M., Yang F. et al. A novel therapy strategy for bile duct repair using tissue engineering technique: PCL/PLGA bilayered scaffold with hMSCs. // Journal of tissue engineering and regenerative medicine. – 2017. – V. 11. – № 4. – P. 966–976.